



TITLE:

インターフェロン作用の研究:細胞増殖制御における役割および感受性変異株の受容体の解析(Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

岩田, 晃

---

CITATION:

岩田, 晃. インターフェロン作用の研究:細胞増殖制御における役割および感受性変異株の受容体の解析. 京都大学, 1989, 理学博士

ISSUE DATE:

1989-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k4133>

RIGHT:

学位申請論文

インターフェロン作用の研究  
細胞増殖制御における役割および感受性変異株の受容体の解析

京都大学大学院理学研究科  
化学専攻博士後期課程  
岩田 晃

学位申請論文

インターフェロン作用の研究

細胞増殖制御における役割および感受性変異株の受容体の解析

京都大学大学院理学研究科

化学専攻博士後期課程

岩田 晃

(昭和62年3月23日 研究指導認定)

## 目 次

要 旨	- - - - -	1
略 号 表	- - - - -	4
<u>序 論</u>		
1	インターフェロン	5
2	IFN の作用	6
	(A) IFN の初期作用	7
	(B) 抗ウイルス作用	8
	(C) 免疫調節作用	10
	(D) 細胞増殖抑制作用	11
3	本研究の概要	12
<u>材料と方法</u>		
1	試薬類	15
2	細胞	17
3	ウイルス	17
4	IFN の定量	18
5	血清飢餓操作	18
6	2-5A 合成酵素の定量	18
7	ノーザン解析	19
8	DNA 合成量の測定	21
9	VSV-RNA 合成量の測定	21
10	細胞増殖の測定	22
11	IFN の $^{125}\text{I}$ 標識	22
12	標識 IFN の細胞への結合	23
<u>結 果</u>		
第一部 増殖因子による 2-5A 合成酵素の誘導と細胞増殖の制御		
1	増殖因子による 2-5A 合成酵素の誘導	25
2	IFN- $\beta$ の生産を介した 2-5A 合成酵素の誘導	31
3	インスリン、FCS による 2-5A 合成酵素 mRNA の誘導	32
4	DNA 合成の調節	36
第二部 Autocrine IFN の作用		
1	増殖刺激によって HeLa S3 細胞の 生産する IFN- $\beta$ の効果	38
2	2-5A 合成酵素 mRNA 誘導に対する サイクロヘキシイミドの効果	41



3	IFN の autocrine 作用に対する 抗 IFN 抗体の抑制効果	- - - - -	43
第三部 IFN- $\gamma$ 低感受性細胞の性質			
1	L1210 細胞株の IFN- $\gamma$ の抗ウイルス作用に 対する感受性	- - - - -	45
2	細胞増殖阻害作用および 2-5A 合成酵素の誘導	- - -	46
3	IFN のレセプター	- - - - -	49
4	L1210 Rg 細胞での IFN レセプター	- - - - -	50
<u>考察</u>			
1	IFN および 2-5A 合成酵素による細胞増殖の調節	- - -	53
2	増殖因子による IFN の誘導	- - - - -	55
3	autocrine IFN の作用	- - - - -	57
4	IFN レセプターと IFN 作用	- - - - -	59
5	2-5A 合成酵素と抗ウイルス作用	- - - - -	63
6	IFN の生体内での作用	- - - - -	64
<u>謝辞</u>			- - - - - 67
<u>参考文献</u>			- - - - - 68

## 要旨

インターフェロン（IFN）はウイルス感染などの刺激で生産され、細胞に作用して抗ウイルス状態を誘導する蛋白性の因子である。それはまた、細胞の増殖を抑制する作用や、免疫反応を制御する作用を有する。IFN はまず、細胞表面のレセプターに結合し、細胞内に（2'-5'）オリゴアデニル酸合成酵素（2-5A 合成酵素）をはじめ種々の酵素、蛋白質を誘導し、その結果、種々の生物活性を表すと考えられている。本研究ではヒトおよびマウスの培養細胞を用いて IFN の作用について解析した。

細胞が増殖・分化するとき IFN が生産されることがいくつかの系で知られているが、その場合の IFN の誘導物質や機能についてはよく判っていない。そこでヒト HeLa S3 細胞の増殖における 2-5A 合成酵素や IFN の役割を検討した。

増殖中のヒト子宮頸部癌由来 HeLa S3 細胞を血清を含まない培地に移すと増殖が抑制される。そのとき血清、血小板由来増殖因子、上皮細胞増殖因子（EGF）、インスリンなど増殖を促進する因子を加えると 2-5A 合成酵素が誘導された。これらの増殖促進因子のうちインスリンが最も高い効果を示したが、それは HeLa S3 細胞の分泌している EGF 様の増殖因子の作用を高めた結果と思われた。

一方、これらの増殖因子による 2-5A 合成酵素の生産は抗 IFN- $\beta$  中和抗体の存在下では見られなかったが、抗 IFN- $\alpha$  抗血清の存在下では影響を受けなかった。したがって、増殖促進因子は IFN- $\beta$  を誘導し、その結果、2-5A 合成酵素の生産が引き起こされたと考えられる。

抗 IFN- $\beta$  抗体を加えて 2-5A 合成酵素の誘導を阻害し、増殖誘

導後の HeLa S3 細胞の DNA 合成を経時的に調べた。細胞増殖が抑制されていた HeLa S3 細胞に血清を加えるといっせいに増殖を開始し、DNA 合成のピークが 12 時間後と 32 時間後に観察された。抗 IFN- $\beta$  抗体は細胞増殖刺激後の最初の DNA 合成のピークにはなんら影響を与えなかったが、次の DNA 合成のピークを増強した。2-5A 合成酵素活性レベルのピークは 2 つの DNA 合成のピークの間観察されたことを考えると、細胞の増殖を促進すると同時に誘導される IFN、2-5A 合成酵素は最初の増殖周期には影響しないが、次の増殖周期で作用することが示された。

分泌された作用物質が分泌細胞自身、もしくは近傍の細胞に作用する場合を autocrine 作用と呼ぶ。細胞が増殖を自己制御する場合、IFN の autocrine 作用は重要であると考えられる。HeLa S3 細胞において増殖因子によって誘導された autocrine IFN- $\beta$  は IFN 活性の定量やノーザン法では検出できないほど少量であったが、2-5A 合成酵素の誘導や DNA 合成の阻害は有意に観察された。IFN は autocrine 作用においてはごく微量でも効果を発揮すると思われる。実際、ヒト HeLa S3 細胞およびマウス L205 細胞で、poly inosinic-polycytidinic acid で IFN を誘導し、生産される IFN の効果を蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドや抗 IFN 抗体で抑制しようと試みた。その結果、autocrine IFN の作用は培地中に IFN を加えた場合の効果に比べ、より高濃度の阻害剤を必要とすることが判明した。

ところで、IFN の作用を調べる場合、IFN に対する感受性が異なる細胞の性質を比較することは有益である。水疱性口内炎ウイルスの増殖抑制で調べたところ、マウス白血病由来 L1210 Sg 細胞株はマウス L1210m 細胞株の 500 倍の濃度の IFN- $\gamma$  を必要とした。

そこで、この2種の細胞の性質を比較し、L1210 Sg 細胞の低感受性の原因を調べた。

L1210 Sg、L1210m 両細胞とも IFN- $\alpha$ 、 $\beta$  では細胞の増殖が抑制されたが、IFN- $\gamma$  では抑制されなかった。また、両細胞での 2-5A 合成酵素の誘導は IFN- $\beta$  では観察されたが、IFN- $\gamma$  では観察されなかった。さらに細胞表面の IFN- $\gamma$  レセプターの数や解離定数は両細胞ともほぼ等しい。これらの点では L1210 Sg 細胞の IFN- $\gamma$  に対する低感受性は説明できない。IFN は細胞表面のレセプターに結合し、その後細胞内に取り込まれ分解される。したがって、細胞に結合した IFN 量の経時変化を調べると最初は増加するが、ピークに達した後減少することが予想される。両細胞で細胞に結合した IFN- $\gamma$  の量の経時変化を調べたところ、L1210 Sg 細胞では細胞に結合した IFN- $\gamma$  の減少量が少なく、逆に L1210m 細胞では著しい減少を示した。以上の結果から、L1210 Sg 細胞の低感受性の原因は細胞に結合した IFN- $\gamma$  の細胞内侵入・分解活性の低下と関連があるように思われた。



## 略 語 表

2-5A	(2'-5') oligoadenylate	(2'-5') オリゴアデニル酸
2-ME	2-mercaptoethanol	
BS	bovine serum	牛血清
BSA	bovine serum albumin	牛血清アルブミン
CPE	cytopathic effect	細胞変性効果
cpu	cytopathic unit	細胞変性単位
DEAE	diethylamino ethyl	
DMEM	Dulbecco's modified MEM	ダルベッコ変法MEM
dsRNA	double-stranded RNA	二重鎖RNA
dThd	deoxythimidine	
EDTA	ethylenediaminetetraacetate	
EGF	epidermal growth factor	上皮細胞増殖因子
FCS	fetal calf serum	仔牛胎児血清
GTC	guanidine thiocyanate	
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxylpiperadine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid	
IFN	interferon	インターフェロン
IU	international unit	国際単位
kb	kilobase	
Kd	dissociation constant	解離定数
MEM	Eagle's minimal essential medium	イーグルの最小必須培地
NDV	Newcastle disease virus	ニューカッスル病ウイルス
NIH	National Insutitute of Health	米国国立衛生研究所
NP40	Nonidet P40	
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝液
2'-PDE	2'-phosphodiesterase	
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板由来増殖因子
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	
poly I:C	polyinosinic-polycytidinic acid	
RNase L	ribonuclease L	リボヌクレアーゼL
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
TCA	trichloroacetic acid	トリクロロ酢酸
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose	組織培養感染力価
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$	
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	
Urd	uridine	
VSV	vesicular stomatitis virus	水疱性口内炎ウイルス

## 序論

### 1 インターフェロン

ウイルスの基本構造は遺伝情報をコードする核酸とそれを保護する蛋白質の外殻から成り、増殖に際しては細胞内に侵入しその代謝機構や合成装置を利用しなければならない。ウイルス感染は時には疾病を引き起こすが、脊椎動物は発達した免疫系の細胞群による防御機構を備えており、侵入したウイルスを排除し感染の拡大を防いでいる。また、個々の細胞のレベルでも細胞内に抗ウイルス機構を誘導し侵入してきたウイルスの増殖を阻害する。細胞の抗ウイルス状態はインターフェロン (IFN) の作用によって誘導される(1)。IFN はウイルスが感染したときに細胞が生産する可溶性の蛋白因子である。IFN は単に抗ウイルス状態を誘導するだけでなく、細胞増殖阻害や免疫系の調節など幅広い活性をも有することが明らかにされている。

IFN とその作用に関してはヒトおよびマウスで最も解析が進み、すでに IFN 分子が精製され(2-5)、遺伝子のクローン化(6-14)も行われた。IFN は産生細胞、アミノ酸配列、抗原性の違いから  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3種類に分類されている(15)。ヒトの3種類の IFN の特徴について表1にまとめた。マウスでも若干の違いはあるが、ほぼ同じ性状の IFN 群が存在する(16)。IFN- $\alpha$  と IFN- $\beta$  は、アミノ酸配列の相同性も高く(17)、また細胞に作用するときの受容体が共通(18)なので、IFN- $\gamma$  と区別して I 型 IFN と称し、IFN- $\gamma$  を II 型 IFN と呼ぶ場合がある。I 型と II 型では分子的な性質のみならず生物活性(19-21)も異なり、II 型 IFN は I 型 IFN に比べて免疫調節因子の作用としての性格が強い。I 型 IFN の生産はウイルス

感染ばかりでなく、二重鎖 RNA ( dsRNA ) によっても誘導される (22)。一般に DNA ウイルスよりも RNA ウイルスの方が誘導能が高い。dsRNA は RNA ウイルスの増殖過程で複製中間体として生じるので、dsRNA が I 型 IFN の細胞内での誘導因子ではないかと考えられている (23)。一方、II 型 IFN は T リンパ球が分裂誘起物質や抗原によって刺激を受けたときなど、免疫原性要因によって誘導される (22,24-27)。

表 1 ヒト IFN の性状—— $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の比較

	I 型		II 型
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
慣用名	leukocyte IFN	fibroblast IFN	immune IFN
遺伝子数 <sup>(6-9)</sup>	> 10	1	1
分子量	18,000-24,000	22,000	20,000、25,000
アミノ酸残基数 <sup>a</sup>	166	166	143
主な産生細胞	B リンパ球	繊維芽細胞	T リンパ球
主な誘導物質	ウイルス <sup>b</sup> 、dsRNA <sup>b</sup>		分裂誘起物質
レセプターの分子量	150,000 <sup>b</sup> 、(29)		50,000、90,000 <sup>(30)</sup>

a 遺伝子の解析から予想されるアミノ酸残基数 (6-9)。IFN- $\gamma$  の c 末端は切断を受け、アミノ酸数が減少する (28)。

b I 型 IFN に共通である。

## 2 IFN の作用

IFN は多様な作用を持つが、その発現には細胞核が必須であることから、IFN によって新たに mRNA や蛋白質が合成され、その結果、様々な効果が生ずると考えられている (31,32)。この章では

まず、IFN の作用の初期における知見を遺伝子発現の制御という観点からまとめ、次に、解析が進んでいる IFN の 3 つの作用、抗ウイルス作用、免疫系の調節作用、細胞増殖阻害作用について順に概説する。

#### ( A ) IFN の初期作用

IFN はまず細胞表面の特異的なレセプターに結合する(33)。レセプターが IFN の作用に必須であることは、レセプターが存在しない細胞では IFN の作用が見られないこと(33)、また、レセプターに結合した IFN 量に相関して IFN の効果が見られること(34)で示されている。IFN はレセプターに結合した後、レセプトソームと呼ばれる小胞の形で細胞内に取り込まれる(細胞内侵入。35,36)。レセプトソームはリソゾームと融合し、内容物である IFN 分子とレセプター分子は分解され、低分子となって細胞外に放出される(37-41)。細胞内侵入とその後の分解の過程はほかの蛋白性ホルモンでも共通に見られ、特に上皮性細胞増殖因子(epidermal growth factor; EGF)やインスリンでよく調べられており、作用発現のメカニズムとの関連が指摘された(42-44)。IFN の場合も細胞内侵入の過程と IFN の作用発現とに関連があるのかどうかを調べた報告が数多くある(39,45-53)が、まだ結論は得られていない。

一方、I 型 IFN を作用させた場合、細胞膜の流動性の変化(54)やサイクリックヌクレオチドの変動(55-57)が観察されている。また、II 型 IFN を免疫細胞であるマクロファージに作用させたとき(58,59)には蛋白質リン酸化酵素 C(60,61)の活性化がおこる。細胞膜の物理的な変化はいわゆるセカンドメッセンジャーを生ずるときに付随すると考えられており、また、サイクリックヌクレオチ



ドや蛋白質リン酸化酵素 C の変動はセカンドメッセンジャーとして機能すると考えられているので、これらの変化が IFN 作用においても細胞内での情報伝達機構として機能している可能性がある。しかし、これらのセカンドメッセンジャーシステムではまだ遺伝子の発現調節との関連が間接的にしか示されておらず、そのメカニズムの解明が急がれている。

#### ( B ) 抗ウイルス作用

ウイルスは自立した代謝系を持たないので、細胞に感染し、その代謝機構を利用して初めて増殖することができる。ウイルスは細胞に侵入すると、まず、ウイルス mRNA が合成される。ウイルス mRNA は細胞の蛋白質合成装置でウイルス蛋白質に翻訳され、それと前後してウイルス遺伝子の複製が開始する。その後、合成されたウイルス蛋白質や核酸はウイルス粒子を形成し細胞外へ出る。IFN が作用した細胞ではウイルス増殖は蛋白質合成 (62-68)、遺伝子複製の開始 (69)、ウイルス粒子形成 (70,71)、細胞外への放出 (72) など、種々の段階で阻害される。その中でも特に蛋白質合成の阻害機構が最もよく研究されている。IFN によって数多くの酵素、蛋白質、mRNA が誘導されるが、(2'-5') オリゴアデニル酸合成酵素 (2-5A 合成酵素)、dsRNA 依存性蛋白質リン酸化酵素、2'-phosphodiesterase (2'-PDE ) の蛋白質合成阻害における役割が明らかにされた (図 1、64,73,74)。

2-5A 合成酵素は dsRNA に結合して活性化され、ATP を 2'-5' ホスホジエステル結合により重合させ、オリゴアデニル酸 (2-5A) を合成する (75-77)。2-5A 分子は細胞内に存在している不活性型リ

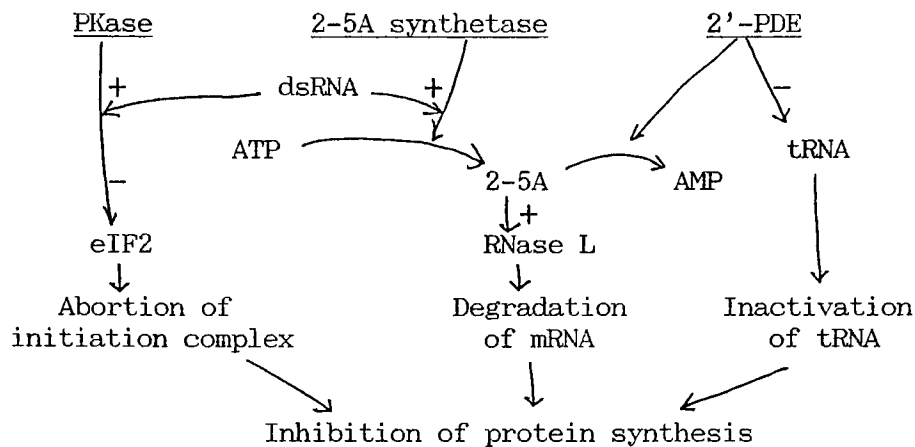


図1 IFN によって誘導される蛋白質合成阻害機構

IFN によって誘導される酵素は下線を付した。活性化の経路には+を、不活性化には-をつけた。図中のPKase はdsRNA 依存性蛋白質リン酸化酵素である(本文参照)。

ボヌクレアーゼ L (RNase L) を活性化し、その結果、mRNA が分解され、細胞の蛋白質合成が抑制される(78-81)。また、2'-PDE は合成された 2-5A 分子を分解する作用を持つほか、tRNA のアミノ酸の受容部位である CCA 末端を切断する機能も有する(82)。

2-5A 合成酵素と RNase L、2'-PDE は 2-5A 分子を中心として蛋白質合成を阻害する 1 つのシステム、2-5A システムを形成する。

dsRNA 依存性蛋白質リン酸化酵素は dsRNA によって活性化され、蛋白質合成の開始複合体の構成要素である eIF2 蛋白質の  $\alpha$  サブユニットをリン酸化して不活性化する(83,84)。そのため、蛋白質合成の初期反応が阻害される(85,86)。

2-5A 合成酵素および dsRNA 依存性蛋白質リン酸化酵素の活性化には dsRNA が要求されることから IFN の作用には dsRNA が中心的

な役割を果たすと考えられるが、それはどこから供給されるのだろうか。RNA ウイルスの遺伝子の複製中間体は二重鎖構造を取る所以、そこから供給されると考えられる(87)。ウイルスの蛋白質合成は選択的に阻害される(62)が、図1に示した蛋白質合成阻害機構がウイルスの複製の場に局在していれば都合よく説明される。実際、レオウイルスでは2-5A システムがウイルス遺伝子の複製の場にあることが示された(65)。一方、DNA ウイルスの場合にはdsRNA の誘導については不明である。その場合はウイルスもしくは細胞由来の mRNA や hnRNA が dsRNA の供給源になるのかも知れない(88,89)。

### (C) 免疫調節作用

免疫機構は生体外からの侵入物を排除するための仕組みとして機能している。免疫機構には非特定な対象に作用する先天性免疫(リゾチームなどの分解酵素や、ナチュラルキラー細胞、貪食作用を持つマクロファージ細胞など)と、特定の対象にのみ反応する特異性の高い獲得免疫(T細胞による細胞性免疫、B細胞が分泌する抗体分子による液性免疫など)とがある。IFN によって誘導される抗ウイルス機構そのものは前者に分類されるが、獲得免疫、先天性免疫の両機構に対しても調節因子として作用する。

IFN は先天性免疫においてはマクロファージ細胞(90-92)、ナチュラルキラー細胞(93)などを活性化する。また、IFN は獲得免疫系の調節に機能する細胞表面にある主要組織特異性抗原(19, 94, 95)、T細胞増殖因子の受容体(96)、Fc $\gamma$  レセプター(97)を誘導する。また、数種の細胞が関与する獲得免疫機構の場合には、移植片の拒絶反応(98)、過敏症(99)などのいわゆる細胞性免疫に対

しては抑制的に働く。一方、液性免疫機構である抗体産生に対しては、IFN の投与量や投与する時期によって増強効果または抑制効果の両方が観察される(101-103)。

IFN- $\alpha$  は B リンパ球、IFN- $\gamma$  は T リンパ球という同じリンパ系の細胞によって産生される(表 1)。免疫刺激の後、まず IFN- $\alpha$  が産生され、続いて IFN- $\gamma$  が産生される(104,105)。また、IFN- $\gamma$  によるマクロファージの活性化は IFN- $\beta$  によって阻害される(106)。これらの結果から、I 型 IFN と II 型 IFN は免疫制御を分担することが示唆される。

#### (D) 細胞増殖阻害作用

細胞増殖は非常に多くの過程を含むが、IFN の阻害作用も DNA 合成の基質であるチミジンの細胞内への取り込みから(107,108)、DNA 合成、細胞接着の足場を提供するコラーゲンの合成(109)に至るまで多岐にわたっている。しかしながら、全体的に見ると IFN は細胞の分裂から分裂までの期間を延長させる(110,111)。

細胞の増殖周期は細胞分裂期(M 期)、DNA 合成期(S 期)、及び、その間の 2 つの間隙期( $G_1$  期、 $G_2$  期)の 4 つの段階に分けられる。それに加えて細胞が増殖周期からはずれ、増殖状態にならない時期を  $G_0$  期と呼ぶ。増殖に必要な栄養分や因子を培養液から除いた場合、もしくは細胞が隙間なく増殖した状態(コンフルエントな状態と呼ぶ)に達すると細胞は  $G_1$  期もしくは  $G_0$  期で増殖を停止する。 $G_0$  期の細胞に増殖因子を加えると、細胞は同調的に増殖を再開する(112-114)。その後、細胞は  $G_1$  期、S 期を通過し、 $G_2$  期、M 期を経て自動的に細胞周期を一周し、 $G_1$  期に戻る(115,116)。同調培養の手法を用いた研究によって、IFN は  $G_1$  期、



G<sub>2</sub> 期の時間を延長したり (117,118)、G<sub>1</sub> 期から S 期への転移速度を低下させる (119) ことなどが明かにされている。特に細胞を同調培養しない場合でも同じ結論が得られている (120,121)。IFN による細胞の体積の増加や多核細胞の出現も観察されることから、M 期の諸反応も阻害されるらしい (110)。

IFN は増殖因子と拮抗的に作用する (122-125)。増殖因子が細胞に作用すると癌遺伝子を含むいくつかの遺伝子の発現が誘導されるが、それらの誘導は IFN 処理によって抑えられる (126-130)。前述した 2-5A システムや dsRNA 依存性蛋白質リン酸化酵素はウイルス増殖阻害のみならず、細胞増殖阻害に関しても重要であると考えられている (64,73,74)。

### 3 本研究の概要

これまで述べたように IFN は細胞に作用して多面的な調節作用を持つことが明らかにされてきた。これらの作用の解析は従来、培養細胞に IFN を加え、その効果を調べるのが主体であった。しかし、IFN のもつ本来の生理的作用は、IFN が生産され、標的細胞に作用するという観点から理解されねばならない。ある細胞集団において、生産・分泌された IFN が産生細胞自身やすぐ近傍の細胞に作用する場合を autocrine 作用と呼ぶ。ウイルス感染によって誘導された IFN は少なくとも近傍の細胞に抗ウイルス状態を誘導し、抗原刺激を受けたリンパ球の生産する IFN はまわりの免疫細胞の活性調節を行うであろう。それならば、細胞増殖の調節作用は、細胞増殖の開始や細胞周期に関連して誘導された IFN によるのではないか。

このような疑問について最近興味ある結果が報告された。血

血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) を G<sub>0</sub> 期にあるマウス Balb/c-3T3 細胞に処理すると 2-5A 合成酵素および IFN- $\beta$  が誘導されることが報告された (131)。また、マウス骨髓細胞を培養する際、コロニー形成促進因子を添加して増殖を促進させると IFN の生産が認められた (132)。この場合、IFN に対する中和抗体を培養液に加えておくと細胞の増殖が促進した (132)。このように、IFN は細胞の増殖刺激と同時に生産され、増殖を制御する可能性が示唆された。

本研究で筆者は血清を含まない培地で培養して増殖を抑制したヒト HeLa S3 細胞に、増殖因子や FCS を添加して増殖を再開させると 2-5A 合成酵素が誘導されることを見いだした。2-5A 合成酵素は増殖因子等で直接誘導されたのではなく、検出できないほどごく微量の IFN- $\beta$  の誘導を介していた。HeLa S3 細胞の細胞増殖制御に 2-5A システムや IFN がどのように関与しているかを調べた結果を結果第一部に示す。

この場合のごく少量の IFN- $\beta$  の働きは autocrine 作用と見なすことができる。HeLa S3 細胞での IFN- $\beta$  の autocrine 作用は培養液に IFN- $\beta$  を加えたときに比べて遥かに高い効果を及ぼした。一般に autocrine 作用はその量に比べて高い効果を及ぼすのだろうか。HeLa S3 細胞およびマウス L205 細胞で行った autocrine IFN 作用の効果についての知見を第二部に示した。

ところで、IFN 作用を理解する目的で IFN の作用に関しても多くの突然変異細胞株が分離され、解析されている (33,34,53,55,57,133-147)。なかでもマウス白血病細胞由来の L1210 細胞株の IFN- $\alpha$  /  $\beta$  感受性株 S、及び非感受性株 R はよく解析され (33,34,134-136,146)、非感受性は IFN- $\alpha$  /  $\beta$  に対するレセプターの欠損による

ことが明らかにされている(33)。これらの細胞株は IFN- $\gamma$  に対しては感受性を有すると報告されているが(135,136)、本研究において用いた L1210 S 株は自然に突然変異を起こして IFN- $\gamma$  に対する感受性が低くなっていることを見いだした。そこで、この細胞を L1210 Sg と名付け、同系統の IFN- $\gamma$  感受性細胞株 L1210m と比較し、その差異を検討したところ、L1210 Sg 細胞の低感受性の原因は細胞に結合した IFN- $\gamma$  の細胞内侵入の低下にあることが示唆された。これらの結果を第三部に示した。

## 材料と方法

### 1 試薬類

イーグルの最小必須培地 (Eagle's minimal essential medium; MEM) (148)、ダルベッコ変法 MEM (Dulbecco's modified MEM; DMEM) (149)、RPMI 1640 培地 (150) は日水製薬から購入した。

仔牛胎児血清 (fetal calf serum; FCS) は GIBCO 社、Hyclone 社から購入した。牛血清 (bovine serum; BS) は滋賀県食肉衛生検査所より供給された牛血液より調製した。血清類は 56°C、30 分間加熱し、非動化したものを用いた。リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) は Dulbecco らの処方 (151) より、カルシウム、マグネシウムを除いて調製した。アール塩類溶液は処方 (152) に基づいて市販の塩類より調製した。

ヒト 2-5A 合成酵素 mRNA を検出するためのプローブ DNA は本研究室で分離されたヒト 2-5A 合成酵素 cDNA を含むプラスミッド、pSP25 (153) もしくはヒト 2-5A 合成酵素遺伝子の第 8 エクソンをプラスミッド pG18 (塩尻ら、未発表) より調製した。ヒト IFN- $\beta$  mRNA の検出用のプローブ DNA (6) は大阪大学細胞工学センターの谷口維紹先生から恵与していただいた。チオシアン酸グアニジン (guanidine thiocyanate; GTC) は Fluka 社から、ATP、dATP、dGTP、dTTP はヤマサ醤油から、牛脾臓由来 DNase I、大腸菌由来 DNA polymerase I は宝酒造から購入した。

[2,8- $^3\text{H}$ ]ATP (比活性 30-50 Ci/mmol)、[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP (比活性 3,000 Ci/mmol)、[methyl- $^3\text{H}$ ]thymidine ( $^3\text{H}$ -dThd、比活性 6.7 Ci/mmol)、 $^{125}\text{I}$ -Bolton-Hunter 試薬 (2,000 Ci/mmol、4,000 Ci/mmol) は New England Nuclear 社から、[5,6- $^3\text{H}$ ]



uridine (  $^3\text{H}$ -Urd、比活性 40-43 Ci/mmol ) はアマシャム・ジャパン社から購入した。

Sephadex G50、polyinosinic-polycytidinic acid ( poly I:C )、PD-10 カラム、poly I:C-agarose はファルマシアから、diethylamino ethyl ( DEAE ) -cellulose、ガラスフィルター GF/A は Whatman 社から、ニトロセルロースフィルターは Schleicher & Schuell 社から、エックス線フィルムは富士フィルムから、増感シートは Dupont Cronex 社から購入した。その他の一般試薬類は、和光純薬工業、半井化学薬品から購入した。

ヒト繊維芽細胞由来 IFN ( IFN- $\beta$ 、ロット番号 BM 532;  $1 \times 10^7$  国際単位 ( international unit; IU、後述 ) /mg タンパク質 ) は東レより、組換え技術により大腸菌で産生し、精製したマウス IFN- $\gamma$  ( 比活性  $10^7$  IU/mg タンパク質 ) (154) は塩野義製薬より供与していただいた。マウス IFN- $\alpha$  および  $\beta$  は、マウス L205 細胞をニューキャッスル病ウイルス ( Newcastle disease virus; NDV ) で誘発した培養上清 (155) から、それぞれの IFN に特異的なラットモノクローナル抗体を結合させたカラムで精製した。各々の比活性は  $10^8$  IU/mg タンパク質である。ヒツジ抗ヒト IFN- $\alpha$  抗血清、ヒツジ抗マウス IFN- $\alpha$  /  $\beta$  抗血清はペンシルバニア大学の Paucker 博士に供与していただいた。これらの抗血清の力価は 1,000 倍希釈液で、それぞれの 1,000 IU/ml IFN を中和する。マウス抗ヒト IFN- $\beta$  モノクローナル抗体 ( 力価; 3,000 倍希釈で 10 IU/ml の IFN- $\beta$  を中和 ) はヤマサ醤油より購入した。

ウシインスリンとウシ血清アルブミン ( bovine serum albumin、fraction V; BSA ) は Sigma 社から、マウス EGF は東洋紡から、PDGF は Collaborative Research 社からそれぞれ購入した。また、

transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は米国国立癌研究所の M. Sporn 博士から供与していただいた。

## 2 細胞

ヒト子宮頸部癌由来 HeLa S3 細胞株は Flow 社より大日本製薬を通じて購入した。マウス胎児繊維芽細胞由来 Balb/c-3T3 細胞株、および Swiss 3T3 細胞由来の EGF 受容体欠損株 NR-6 細胞株 (156) は岐阜薬科大学生物化学教室の河野通明博士より供与された。マウス胎児繊維芽細胞由来 L205 細胞株は本研究室で L929 細胞より分離された株を用いた。ヒト羊膜由来 FL 細胞株は本研究室でヒト IFN 定量に用いている株を用いた。マウス白血病細胞由来 L1210 細胞の IFN- $\alpha$  /  $\beta$  感受性株 S および非感受性株 R (134) はフランス癌研究所の I. Gresser 博士より供与していただいた。これら 2 種の L1210 細胞株は以前報告された IFN 感受性 (135, 136) に比べて低い IFN- $\gamma$  感受性を有していることが判明したので、本論文においては L1210 Sg、L1210 Rg と称した。これらの細胞とは独立の L1210 細胞を本学理学部の村松繁博士から供与していただき、本論文においては L1210m 株と称した。L1210m 株は高い IFN- $\gamma$  感受性を持っている。

HeLa S3 細胞は 10% FCS を含む DMEM 培地で 3-4 日毎に継代し維持した。Balb/c-3T3 細胞および NR-6 細胞は 10% CS を含む DMEM 培地で、L205 細胞は 5% BS を含む MEM 培地で、FL 細胞は 5% FCS を含む MEM 培地で、3 種の L1210 細胞は 10% FCS を含む RPMI 1640 培地で培養した。

## 3 ウイルス

水疱性口内炎ウイルス ( vesicular stomatitis virus; VSV ) 、  
ニュージャージー株はハムスター BHK 細胞で、シンドビスウイルス  
はマウス L929 細胞で感染増殖させた培養上清を、細胞破片を除去  
した後保存した。NDV は卵令 10 日の鶏卵に接種し、増殖させた  
後、漿尿液から回収した。

#### 4 IFN の定量

ヒト IFN 活性は FL 細胞とシンドビスウイルスの組み合わせで、  
マウス IFN 活性は L205 細胞と VSV との組み合わせで、抗ウイルス活  
性を指標に測定した。具体的には以下の通りである。96 穴ブ  
レートに細胞を植え込み、検体を加え 1 日培養した後、 $10^3$  組織培  
養感染力価 ( tissue culture infectious dose; TCID<sub>50</sub> ) に相当  
するウイルス量を用いて感染させ、生じる細胞変性効果 ( cytopathic effect; CPE ) を 50% 阻止する検体の希釈度を測定し、  
細胞変性単位 ( cpu ) とした。同時に米国国立衛生研究所 ( Na-  
tional Institute of Health; NIH ) より提供された IFN 国際標準  
試料 ( ヒト IFN- $\beta$  ; NIH cat. No. G203-902-527、マウス IFN- $\alpha$  /  $\beta$   
; NIH cat. No. G002-904-511 ) で cpu を測定し、国際単位 ( IU )  
に換算した。

#### 5 血清飢餓操作

HeLa S3 細胞は血清を含まない DMEM 培地で 36 時間培養するこ  
とで、Balb/c-3T3 細胞、NR-6 細胞は 2% BS を含む DMEM 培地で 5-7  
日培養することで血清飢餓操作を行った。

#### 6 2-5A 合成酵素の定量 (157)

2-5A 合成酵素の抽出、反応、生成物の分離には 50 mM もしくは 300 mM の塩化カリウムを含む HGB 緩衝液（それぞれを 50 HGB、300 HGB と称する）を用いた。HGB 緩衝液は 10 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-KOH (pH 7.5)、0.02% アジ化ナトリウム、3 mM 酢酸マグネシウム、0.3 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetate; EDTA)、20%(v/v) グリセリンを含む。

細胞を 0.5% Nonidet P40 (NP-40)、0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、7 mM 2-mercaptoethanol (2-ME) を含む 300 HGB に溶解し、不溶成分を遠心除去した。得られた細胞溶解液（タンパク質 50  $\mu$ g）を 25  $\mu$ l の poly I:C-agarose ビーズに吸着させた後、50 HGB でビーズを洗浄し、0.5 mM  $^3$ H-ATP ( $3 \times 10^7$  cpm/ml) を含む 50 HGB を 20  $\mu$ l 加えて 33°C、2 時間保温して反応を行わせた。反応生成物を DEAE-cellulose ビーズで未反応の ATP モノマーとオリゴマーとに分離し、オリゴマーに取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

## 7 ノーザン解析

RNA の抽出、電気泳動、ニトロセルロースフィルターへの転移、ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィの方法は成書にしたがった(158)。

細胞を 0.5% ラウリルサルコシン酸ナトリウム、5 mM クエン酸ナトリウム、0.1 M 2-ME を含む 4 M GTC 溶液に溶解し、100 mM EDTA を含む 5.7 M 塩化セシウム溶液上に重層し、ベックマン社製遠心機で SW 50.1 ローターを用いて 35,000 rpm で 18 時間室温で遠心し、RNA 沈澱を回収した。

RNA ( 15  $\mu\text{g}$  ) を 50% ホルムアミド、6.7% ホルムアルデヒドを含む M 緩衝液 ( 20mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid-KOH (pH 7.0)、15 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA を含む ) 30  $\mu\text{l}$  に溶解し、55°C で 15 分間加温し変性させたのち、6.4% ホルムアルデヒドを含む M 緩衝液で作成した 1.3% アガロースゲル中で電気泳動を行った。電解液には M 緩衝液を用いた。泳動後のゲルを水中で 30 分間浸してから 20x SSC ( 1x SSC は 0.015 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.15 M NaCl である ) を用いてニトロセルロースフィルターへの転移を行った。80°C 2 時間低圧中で加熱した後、ハイブリダイゼーションに供した。

プローブ DNA の標識はニックトランスレーション法で行った。0.3  $\mu\text{g}$  のプローブ DNA を 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl (pH 7.8)、5 mM 塩化マグネシウム、10 mM 2-ME、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA、dATP、dGTP、dTTP それぞれを 0.15 mM 含む水溶液 30  $\mu\text{l}$  に溶解し、0.3  $\mu\text{g}$  DNase I、10 U DNA polymerase I と 30  $\mu\text{Ci}$  の  $[\alpha -^3\text{P}]$  dCTP を加えて 15°C、2 時間反応させた。3  $\mu\text{l}$  の 0.5 M EDTA、20% ドデシル硫酸ナトリウム ( sodium dodecyl sulfate; SDS ) を加えて反応を停止させ、径 4 mm、長さ 12 cm の Shepadex G50 カラムを用いて未反応の  $[\alpha -^3\text{P}]$  dCTP を除いてハイブリダイゼーションに供した。

フィルターを 3x SSC、0.1% SDS を含む Denhardt 溶液 ( Denhardt 溶液は BSA、Ficoll 400、polyvinylpyrrolidone をそれぞれ 0.02% 含む ) で、20 分間 42°C で処理した後、H 溶液 ( 0.1% SDS、5x Denhardt、5x SSC、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.25 mg 変性サケ精子 DNA、10%(w/v) デキストラン硫酸 ) 中で 42°C で 12 時間プレハイブリダイゼーション処理した。フィルターを上記の  $^3\text{P}$

で標識したプローブ、 $5-10 \times 10^6$  cpm を加えた 2.4 ml の H 溶液中に移し、さらに  $42^\circ\text{C}$  で 18-24 時間保温し、ハイブリダイゼーション処理を行った。室温でフィルターを洗浄後、0.1% SDS を含む  $0.2 \times \text{SSC}$  溶液中で  $60^\circ\text{C}$ 、30 分間浸透する操作を 3 回繰り返し、非特異的に結合している標識プローブを除いた。フィルターを風乾後、増感シートを用いて  $-80^\circ\text{C}$  でオートラジオグラフィを行った。

## 8 DNA 合成量の測定

細胞の DNA 合成量は  $^3\text{H}$ -dThd のトリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid; TCA) 不溶画分への取り込み量を指標にして測定した。細胞を  $2 \mu\text{Ci/ml}$  の  $^3\text{H}$ -dThd 存在下で 1 時間 (HeLa S3 細胞)、もしくは 4 時間 (Balb/c-3T3 細胞、NR-6 細胞) 培養した後、0.5% SDS で細胞を溶解し、等量の 10% TCA を加えて氷上で 1 時間放置し、沈澱を形成させた。ガラスフィルターで沈澱を集め、5% TCA で 4 回、エタノールで 3 回洗浄した後シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

## 9 VSV-RNA 合成量の測定

VSV は RNA ウイルスなので RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを使って自身のゲノムや mRNA を合成する。一方、細胞は DNA 依存性の RNA ポリメラーゼを使って RNA 合成を行う。そこで、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの阻害剤であるアクチノマイシン D の存在下で細胞に VSV を感染増殖させると合成される RNA の大部分が VSV-RNA である。このことを利用して、VSV の RNA 合成量を測定した。

$1 \times 10^6$  細胞/ml の L1210 Sg 細胞、 $4 \times 10^5$  細胞/ml の L1210m 細胞を 1% FCS を含む RPMI 1640 培地で IFN 存在下、非存在下で 12 時

間培養し、0.03 TCID<sub>50</sub>/細胞の VSV を 5 µg/ml アクチノマイシン D 存在下で感染させた。L1210 Sg 細胞は 3 時間後に、L1210m 細胞は 2 時間後に <sup>3</sup>H-Urd を加え (5 µCi/ml)、さらに 3 時間 (L1210 Sg 細胞)、2 時間 (L1210m 細胞) 培養した。細胞を 5% TCA で 3 回洗浄して TCA 可溶画分の放射活性を除去した後、エタノールで 2 回洗浄した。細胞に残った TCA 不溶画分の放射活性は、0.5% SDS で細胞を溶解したのちシンチレーションカウンターで測定し、RNA 合成量とした。VSV-RNA の合成量は、VSV を感染させた細胞での TCA 不溶画分への取り込み量から、非感染細胞での取り込み量を差し引いて計算した。

#### 10 細胞増殖の測定

L1210 Sg および L1210m 細胞を 10<sup>5</sup> IU/ml の IFN 存在下、非存在下で培養し、細胞数をコールターカウンターで測定した。

#### 11 IFN の <sup>125</sup>I 標識

30 µg のマウス IFN-γ を 500 µCi の <sup>125</sup>I-Bolton-Hunter 試薬と 20 µl の 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.1) 中で混合し、20 分間、水中で反応させた。200 µl の 1 M グリシン水溶液を加えて反応を停止させた後、PD-10 カラムを用いたゲル濾過操作で未反応試薬を分離除去した。ゲル濾過操作に用いた溶出緩衝液には 0.25% セラチン、0.1 mM PMSF を含む PBS を用いた。

マウス IFN-β の標識も同様の手順で行った。20 µg のマウス IFN-β と 1 mCi の <sup>125</sup>I-Bolton-Hunter 試薬を 1 時間、水中で反応させた。溶出緩衝液には 40% エチレングリコール、0.25% セラチン、0.1 mM PMSF を含む PBS を用いた。

両試料とも最初に出現する放射活性のピークを標識 IFN 試料とし、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で純度を確認した後、結合実験に用いた。抗ウイルス活性で測定した回収率は両反応で約 80% であった。また、それぞれの標識 IFN の放射比活性は 300-500 cpm/IU であった。

## 12 標識 IFN の細胞への結合量の測定

IFN は細胞表面に存在するレセプター分子に高い親和性を持って結合する。この結合は IFN 分子以外では競合されないという点において特異的である。また、この性質が標識 IFN を用いた結合実験でのレセプターの定義である。本報告では精製した IFN 分子を Bolton-Hunter 法で  $^{125}\text{I}$  で標識し結合実験に用いた。また、標識 IFN の細胞に対する全結合量のうち非標識の IFN 分子で競合される結合量を IFN レセプターの量と見なした。

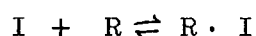
結合実験用培地（細胞の増殖用培地に 20 mM HEPES (pH 7.3) を加えたもの）中で各細胞を各標識 IFN と混合し、標識 IFN- $\beta$  の場合は 3 時間、標識 IFN- $\gamma$  の場合は 5 時間保温した。L1210 細胞の浮遊液を 10% 蔗糖、5% BS を含むアール塩類溶液の上に重層し、6,000x g で 5 分間遠心操作を行って細胞を沈澱させ、未結合の標識 IFN を除いた。細胞の沈澱に結合している放射活性をガンマカウンターで測定した。

非特異的結合量を調べるため、200 倍量の非標識 IFN の存在下でも同様の結合実験を行った。特異的結合は、全結合量から非特異的結合量を差し引いて計算した。本報告では特異的結合量をデータとして掲載している。非特異的結合は特異的結合量の 3 分の 1 以下であった。



IFN とレセプターの解離定数、また細胞あたりのレセプター数は Scatchard 解析 (159) により求めた。この方法では IFN とレセプターとの結合が平衡に達したときの結合量を仮定している。データには示さなかったが、結合が平衡に達する時間は IFN- $\beta$  で 3 時間、IFN- $\gamma$  では 5 時間必要であった。

IFN (I) とレセプター (R) の結合反応は次の式で表される。



この式から結合反応が平衡状態にあるとき、解離定数を  $K_d$  とすれば、以下の式が成立する。

$$K_d = [R \cdot I] / ([I] \cdot [R]) \quad \cdot \cdot \quad (1)$$

但し、 $[R \cdot I]$  は IFN-レセプター複合体の濃度、 $[I]$  及び  $[R]$  はそれぞれ、IFN およびレセプターの非結合分子の濃度である。いま、 $[R_0]$  をレセプターの全濃度とすれば、

$$[R] = [R_0] - [R \cdot I]$$

となり、(1) 式は次のように変形される。

$$[R \cdot I] / [I] = -K_d \cdot ([R \cdot I] - [R_0])$$

$[R \cdot I] / [I]$  を縦軸に、 $[R \cdot I]$  を横軸にとり、グラフを描けば、グラフの傾きから  $K_d$  を、横軸との切片からレセプター数を得る。

## 結果

### 第一部 増殖因子による 2-5A 合成酵素の誘導と細胞増殖の制御

細胞が増殖するとき、ある特定の段階で 2-5A 合成酵素や IFN の誘導が観察されている。例えば、細胞がコンフルエントになったとき (169)、増殖因子によって細胞の増殖が促進されたとき (131, 132) に誘導される。また、生体内では肝臓の再生のときには 2-5A 合成酵素のレベルが低下する (170)。通常の細胞周期の制御において 2-5A 合成酵素や IFN はどのようにかかわっているのだろうか。本研究ではヒト HeLa S3 細胞を用いて実験を行った。細胞周期をそろえたり培養液に含まれている FCS 中の増殖因子の影響を除去するために、HeLa S3 細胞を血清を含まない培地に移して細胞増殖を抑制した (血清飢餓操作)。このような HeLa S3 細胞に増殖因子や FCS を加えると 2-5A 合成酵素が誘導され、HeLa S3 細胞の DNA 合成が抑制されていることが判明した。以下にその結果を示した。

#### 1 増殖因子による 2-5A 合成酵素の誘導

ヒト HeLa S3 細胞を血清を含まない DMEM 培地に換えて培養すると、細胞は球状になり、増殖が抑制される。この状態で 36 時間培養した後、FCS を加えると細胞は平板な形を回復し、増殖を開始するが、それに伴って細胞内に 2-5A 合成酵素の誘導が観察された。図 2 に示すように、2-5A 合成酵素の活性は FCS を加えてから 24 時間後にピークに達し、その後、初期値に低下した。FCS を加えずそのまま培養していた細胞ではこの間ピークは観察されなかった。

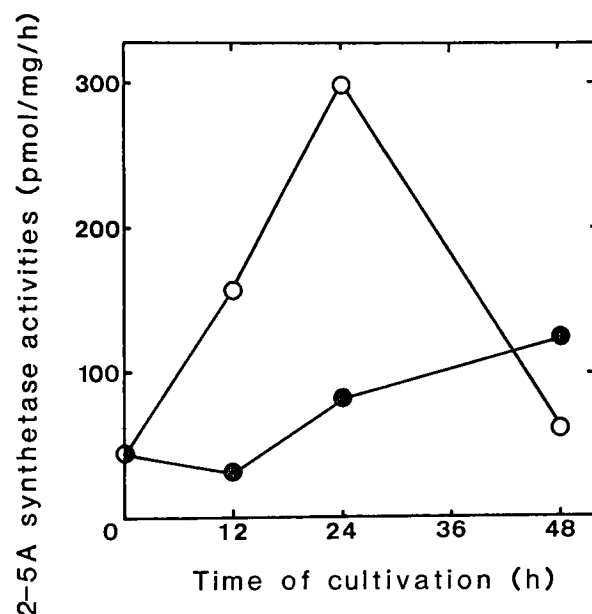


図2 血清飢餓操作を行ったHeLa S3細胞でのFCSによる2-5A合成酵素の誘導。  
HeLa S3細胞を血清を含まないDMEM培地で36時間培養し、血清飢餓操作を行った。5% FCSを加え(○)、もしくは加えずに(●)引続き培養して、0、12、24、48時間後に細胞を回収し、2-5A合成酵素の活性を測定した。グラフの横軸はFCSを加えた時間を0として表示した。

2-5A合成酵素はFCS中に含まれる増殖因子によって誘導されたのではないかと考え、典型的な増殖因子であるEGF、PDGFおよびインスリンをそれぞれ血清飢餓操作を行ったHeLa S3細胞の培養液に加えて2-5A合成酵素が誘導されるか否かを調べた。表2に示すように、これら3種の増殖因子の処理によって2-5A合成酵素が誘導された。そのうちインスリンが最も効果的であった。しかしながら10  $\mu\text{g/ml}$ のインスリンで誘導される2-5A合成酵素の量は、200 IU/mlのIFN- $\beta$ で誘導される量の約10分の1であった。EGF

表2 増殖因子による2-5A 合成酵素の誘導

Treatment	2-5A synthetase activity (pmol/mg/h)	IFN activity (IU/ml)
No addition	21	<10
FCS	76	<10
FCS+IFN- $\beta$	1600	nt <sup>+</sup>
EGF	47	<10
PDGF	70	<10
Insulin	150	<10
Insulin+EGF	290	<10

+nt: not tested

HeLa S3 細胞を血清を含まないDMEM 培地で36 時間培養した後、表に示すような増殖因子等を加えて24 時間培養した。細胞を0.5% NP40 を含む300 HGB 緩衝液で溶解後、2-5A 合成酵素の活性を測定した。また同時に培養上清中のIFN 活性も測定した。用いた増殖因子等の濃度は以下の通りである。FCS 5%、IFN- $\beta$  200 IU/ml、EGF 100 ng/ml、PDGF 1 unit/ml、insulin 20  $\mu$ g/ml。

単独では誘導される2-5A 合成酵素の量はそれほど多くはなかったが、EGF とインスリンを同時に加えるとより多量の2-5A 合成酵素が誘導された。また細胞の培養上清中のIFN 活性はいずれの場合でも検出できなかった。

表3 はインスリンの2-5A 合成酵素の誘導に対する血清飢餓操作の影響を示したものである。血清を含んだ培養液で正常に増殖しているHeLa S3 細胞にインスリンを添加しても2-5A 合成酵素の誘導はまったく見られなかった。この結果から血清飢餓操作は必須であると考えられる。増殖中の細胞集団は、細胞周期のG<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M期の全ての段階に属する細胞を一定の割合で含んでいる。インスリンは細胞周期のある段階の細胞に作用して一過的に2-5A 合成酵素を誘導すると考えられるので、全体としては有意な値として検出できなかったのであろう。

表3 インスリンによる2-5A 合成酵素の誘導に対する血清飢餓操作の影響

Treatment	2-5A synthetase (pmol/mg/h)
Starved	
No addition	610
FCS	1,400
Insulin	1,900
Not starved	
No addition	470
Insulin	490

Starved の場合は血清飢餓操作を表2と同様に行った。 Not starved の場合は増殖中の細胞にインスリンを加えた。 FCS は5%、insulin は20  $\mu\text{g/ml}$ を加え、24 時間後に2-5A 合成酵素の定量を行った。

血清に含まれる蛋白質の大部分はBSA で、増殖因子の濃度は極めて低い。 また、非特異的な蛋白質の添加で血清飢餓操作を行ったHeLa S3 細胞で2-5A 合成酵素が誘導された可能性もある。 そこでBSA を添加することで2-5A 合成酵素が誘導されるか否かを調

表4 BSA 添加の効果

Treatment	2-5A synthetase (pmol/mg/h)
No addition	110
insulin	890
BSA	55

血清飢餓操作を行ったHeLa S3 細胞に20  $\mu\text{g/ml}$  のinsulin、200  $\mu\text{g/ml}$  のBSA を加え、24 時間後に2-5A 合成酵素の定量を行った。

べた（表4）。20  $\mu\text{g/ml}$  のインスリンを加えると2-5A 合成酵素レベルが何も処理しなかったときの8倍に上昇した。一方、インスリン濃度の10倍に相当する200  $\mu\text{g/ml}$  のBSAを加えたが2-5A 合成酵素の誘導は全く見られず、逆に低下した。

インスリンの作用は他の増殖因子と協同的に働いてその効果を高めるのであって、インスリン自身にはDNA合成の促進作用はないと考えられている(112-114)。DNA合成の促進と2-5A 合成酵素の誘導とが関連しているのだとすれば、HeLa S3細胞がインスリンと協同的に働く増殖促進因子を分泌している可能性が生じる。実際、多くの腫瘍細胞が増殖因子を分泌していることが知られている(160,161)。そこで、HeLa S3細胞の無血清培養上清が増殖因子を含むか否かをマウスBalb/c-3T3細胞、NR-6細胞(156)のDNA合成を促進するか否かで検討した(表5)。NR-6細胞はEGF受容体を欠損している細胞株である。対照実験としてDMEM培地にEGFやインスリン、PDGF、TGF- $\beta$ を加えた場合のBalb/c-3T3細胞とNR-6細胞のDNA合成量を調べた。

予想されたようにBalb/c-3T3細胞のDNA合成はEGFの添加で促進されたが、NR-6細胞では促進されなかった。PDGF、TGF- $\beta$ 処理によってBalb/c-3T3、NR-6細胞の両方の増殖が促進された。インスリン単独ではこれらの細胞のDNA合成は促進されない。

問題のHeLa S3細胞の無血清培養上清は単独処理でBalb/c-3T3細胞のDNA合成を促進したが、NR-6細胞のDNA合成は促進しなかった。インスリンとEGFを併用するとBalb/c-3T3細胞でDNA合成が増強され、同様に、HeLa S3細胞の培養上清でもインスリンに

表 5 HeLa S3 細胞の無血清培養上清中の増殖促進活性

Treatment	Incorporation of $^3\text{H}$ -dThd( $\times 10^3\text{cpm}$ )	
	Balb/c-3T3	NR-6
実験 1		
DMEM		
+none	5.6	2.9
+EGF	64.7	3.3
+PDGF	83.4	13.8
+Insulin	2.9	3.5
+EGF+Insulin	97.6	3.9
Supernatant		
+none	29.5	3.6
+EGF	81.3	3.0
+PDGF	85.1	21.5
+Insulin	53.3	7.0
実験 2		
DMEM		
+none	0.5	0.6
+EGF	18.0	0.6
+PDGF	44.5	8.2
+TGF- $\beta$	11.6	3.4

血清飢餓状態のHeLa S3 細胞を、血清を含まないDMEM 培地に交換し、さらに1 日培養したものをHeLa S3 細胞の無血清培養上清 (supernatant) とした。Balb/c-3T3 細胞、NR-6 細胞は2% BS を含む培地で1 週間培養して増殖を停止させた。表に示した各検体を加えた後、培養20 時間と24 時間の間の $^3\text{H}$ -dThd のTCA 不溶画分への取り込み量を調べた。EGF、PDGF、insulin の濃度は表2 に示した濃度を用いた。また、TGF- $\beta$  は2.5 ng/ml、DMEM およびsupernatant は50%(v/v) の濃度を用いた。

よる増強が見られた。一方、NR-6 細胞ではインスリンによるEGF の作用の増強は見られなかった。しかし、HeLa S3 細胞の無血清培養上清の効果はインスリンによって僅かであるが、増強された。以上の結果から、HeLa S3 細胞は主としてEGF レセプターを介して作用する増殖因子を分泌していると思われる。

表6 に静止期にあるBalb/c-3T3 細胞にHeLa S3 細胞の無血清培養上清を加えたときの2-5A 合成酵素の誘導を検討した結果を示

表6 Balb/c-3T3 細胞での2-5A 合成酵素の誘導

Treatment	2-5A synthetase activity (pmol/mg/h)
No addition	200
Supernatant	120
Insulin	110
Supernatant+insulin	330
EGF	340
IFN- $\beta$	330

増殖を静止させたBalb/c-3T3 細胞に表に示す検体を加え、24 時間後に2-5A 合成酵素の活性を調べた。supernatant は表4と同様にして調製した。また、用いた検体濃度も表3と同様である。

す。 静止期にある Balb/c-3T3 細胞にの 2-5A 合成酵素レベルは高かったが、HeLa S3 細胞の培養上清やインスリンを加えると低下した。しかし、上清とインスリンを同時に加えると2-5A 合成酵素のレベルは上昇し、IFN- $\beta$  もしくは EGF で誘導したレベルに達した。

## 2 IFN- $\beta$ の生産を介した2-5A 合成酵素の誘導

2-5A 合成酵素は IFN によって誘導される酵素として知られている。ところが血清飢餓操作を行った HeLa S3 細胞を増殖因子や FCS で誘導した後の培養上清には IFN 活性は検出できなかった(表2)。しかしながら、実験的には検出されない少量の IFN が産生され、それによって2-5A 合成酵素が誘導された可能性がある。そこで、増殖因子を加えると同時に IFN に対する中和抗体を加えて2-5A 合成酵素の誘導がどのような影響を受けるかを調べた。表7に示すように、抗 IFN- $\beta$  モノクローナル抗体を加えたときには2-5A 合成酵素の誘導は抑えられた。しかし、抗 IFN- $\alpha$  抗血清を添加しても抑制されなかった。



表 7 2-5A 合成酵素の誘導に対する抗 IFN 抗体の影響

Treatment	2-5A synthetase activity (pmol/mg/h)
実験 1	
No addition	21
Anti-IFN-( $\alpha + \beta$ )	18
FCS	76
FCS +anti-IFN- $\alpha$	74
FCS +anti-IFN- $\beta$	38
実験 2	
No addition	19
Insulin	240
Insulin +anti-IFN- $\alpha$	190
Insulin +anti-IFN- $\beta$	10

血清飢餓操作を行った HeLa S3 細胞に FCS、insulin を加えると同時に抗 IFN 抗体を加え、24 時間後に 2-5A 合成酵素の活性を測定した。用いた抗体の濃度は原液の 1,000 分の 1 である。FCS、insulin の濃度は表 2 に記載した濃度を用いた。

図 3 は最も高い誘導効果を示した EGF とインスリンを同時に血清飢餓状態の HeLa S3 細胞に加えたときの 2-5A 合成酵素誘導の時間変化と、そのときの抗 IFN- $\beta$  抗体の効果を示したものである。FCS で誘導したときと同様、この場合も 2-5A 合成酵素の誘導は一過的であり、18 時間後に誘導のピークが見られた。2-5A 合成酵素の誘導は抗 IFN- $\beta$  抗体の添加によって完全に押えられた。これらの結果から、増殖刺激による 2-5A 合成酵素の誘導は少量の IFN- $\beta$  の産生を介していることが示された。

### 3 インスリン、FCS による 2-5A 合成酵素 mRNA の誘導

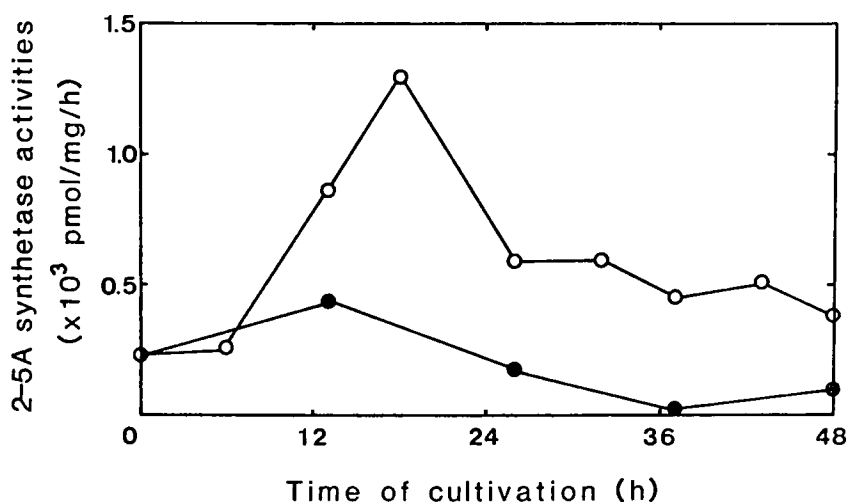


図3 EGF とインスリンによる2-5A 合成酵素の誘導と抗IFN- $\beta$ 抗体の影響。  
血清飢餓操作を行ったHeLa S3 細胞にEGF とインスリンを加え、抗IFN- $\beta$ 抗体存在下(●)、非存在下(○)で引続き培養した。用いた抗IFN- $\beta$ 抗体の濃度は原液の1,000分の1である。

ヒト細胞で誘導される2-5A 合成酵素 mRNA は今のところ2種類が知られている(162)。1つは1.6 kilobase (kb)、他方は1.8 kbの長さを持ち、共通な遺伝子から転写されるが、異なった切断再結合の過程を経る結果、カルボキシル基側のアミノ酸配列をも含む3'領域が異なっている(162)。そこで、これらの2種類のmRNAそれぞれに特異的なプローブを用いて、インスリンやFCSによって誘導される2-5A 合成酵素 mRNA についてノーザン解析を行い(153)、両者の誘導に差がないかを調べた。

図4に示すように、FCS、インスリンで誘導される2-5A 合成酵素の mRNA 分子種は、IFN- $\beta$ によって誘導されるものと同じ、1.6

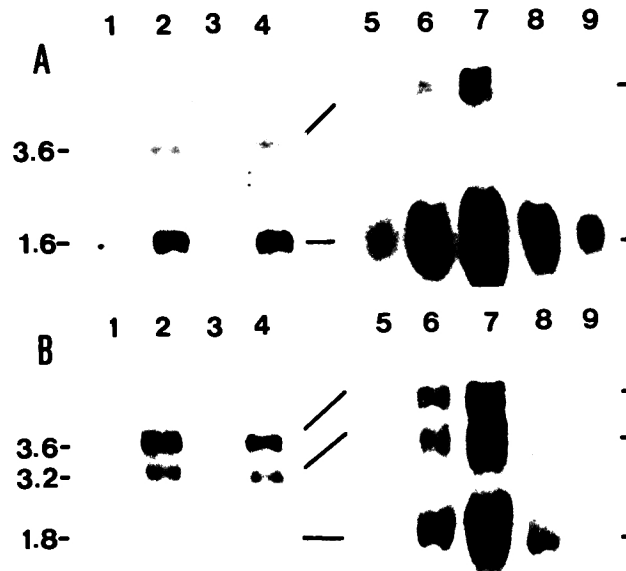


図4 FCS、インスリンによる2-5A 合成酵素mRNA の誘導と抗IFN- $\beta$ 抗体の影響。

血清飢餓操作を行ったHeLa S3 細胞をFCS、インスリンで増殖刺激を行った後、18 時間後に細胞からRNA を抽出し、材料と方法に示した手順で2 種類の2-5A 合成酵素のプロープDNA を用いてノーザン解析を行った(134)。A, 1.6 kb mRNA プロープを用いた解析。B, 1.8 kb mRNA プロープを用いた解析。各レーンは次の検体から調製したRNA を電気泳動した。1、5: 増殖誘導をしなかった細胞。2、6: 5 % FCS で増殖誘導した細胞。3: 5 % FCS で誘導した際抗IFN- $\beta$  抗体を加えた細胞。4、7: 200 IU/ml IFN- $\beta$  で誘導した細胞。8: 10  $\mu$ g/ml インスリンで誘導した細胞。9: 抗IFN- $\beta$  抗体存在下でインスリンで誘導した細胞。用いた抗IFN- $\beta$  抗体の濃度は原液の1,000 分の1である。

kb と1.8 kb の2 種類であった。3.2 kb, 3.6 kb の大きさを持つ2-5A 合成酵素RNA はmRNA の前駆体と考えられている(162)が、これらのパターンもIFN- $\beta$  で誘導したときと同一であった。さらに、抗IFN- $\beta$  抗体を加えるとこれらの2-5A 合成酵素のmRNA の誘導

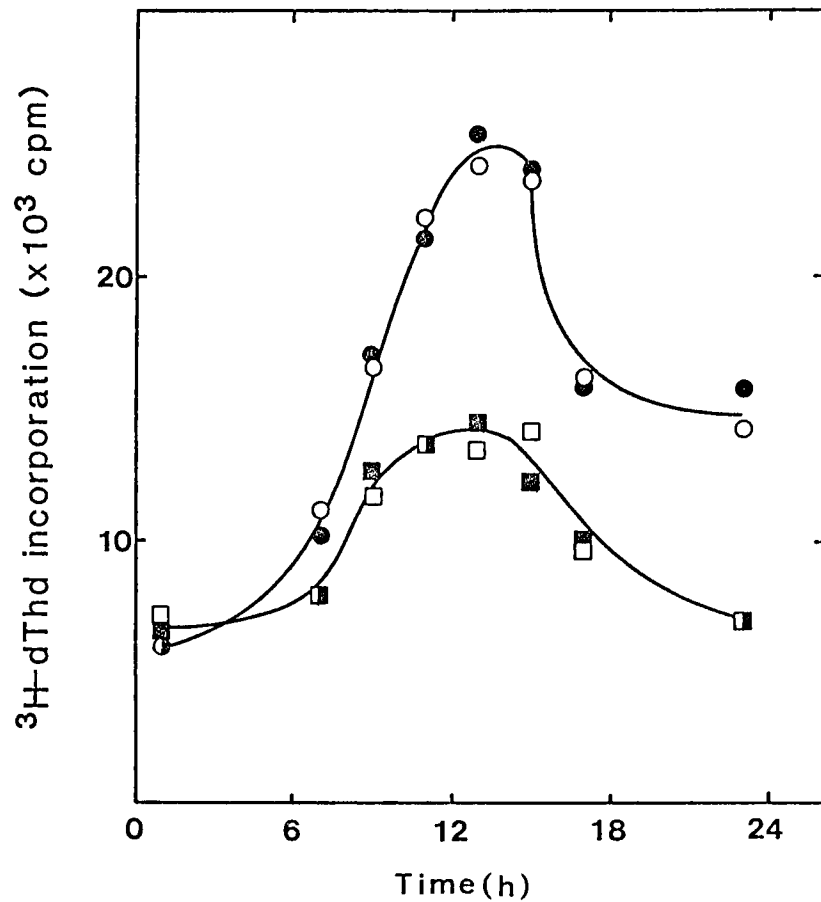


図5 FCS、インスリンによるDNA合成の促進。

血清飢餓操作を行ったHeLa S3細胞にFCSもしくはインスリンを加え、経時的に $^3\text{H}$ -dThdのTCA不溶画分への取り込み量を調べた。(○、●)：FCSで誘導した細胞。(□、■)：インスリンで誘導した細胞。(○、□)：抗IFN- $\beta$ 抗体無添加。(●、■)：抗IFN- $\beta$ 抗体添加

が押えられた。この結果から、2-5A合成酵素の誘導は遺伝子レベルでおこっていること、またIFN- $\beta$ の誘導を介していることが示された。

#### 4 DNA 合成の調節

以上の結果から血清飢餓操作を行った HeLa S3 細胞に FCS や増殖因子を加えると一過的に 2-5A 合成酵素が誘導され、それは IFN の生産を介していることが判明した。そこで、誘導される 2-5A 合成酵素が DNA 合成をどのように調節しているかを検討するために、抗 IFN- $\beta$  抗体の存在下、非存在下で DNA 合成の時間変化を調べた。

図 5 は、血清飢餓操作を行った HeLa S3 細胞に FCS やインスリンを加えた場合の DNA 合成の変化と、それに対する抗 IFN- $\beta$  抗体の効果を示したものである。血清飢餓操作により細胞周期がかなりそろっているので、DNA 合成は同調的に進行し、12 時間後にピークが観察された。しかし、この期間では抗 IFN- $\beta$  抗体の影響は全く見られなかった。

図 2、図 3 で示したように 2-5A 合成酵素の誘導がピークになるのは細胞増殖刺激を行った後 18 時間後から 24 時間後である。すると、2-5A 合成酵素の影響は最初の DNA 合成の期間には見られないと考え、次に、2 回目のピークに至るまでの期間の DNA 合成の時間変化を追跡し、抗 IFN- $\beta$  抗体の影響を調べた。EGF とインスリンで増殖を誘導した場合には DNA 合成は 1 回目のピークに達しただけで、以後 DNA 合成は低い値にとどまった（データ省略）ので、FCS を添加した場合の結果のみを図 6 に示す。FCS を加えた後、1 回目の DNA 合成のピークは 12 時間後に、2 回目のピークは 32 時間後に見られた。図 5 の結果と同様に抗 IFN- $\beta$  抗体の影響は最初の DNA 合成には全く見られなかった。一方、2 回目のピークでは抗 IFN- $\beta$  抗体を加えることによって DNA 合成量が有意に増強された。この結果から DNA 合成は明らかに IFN や 2-5A システムによ

って制御されていることが示された。

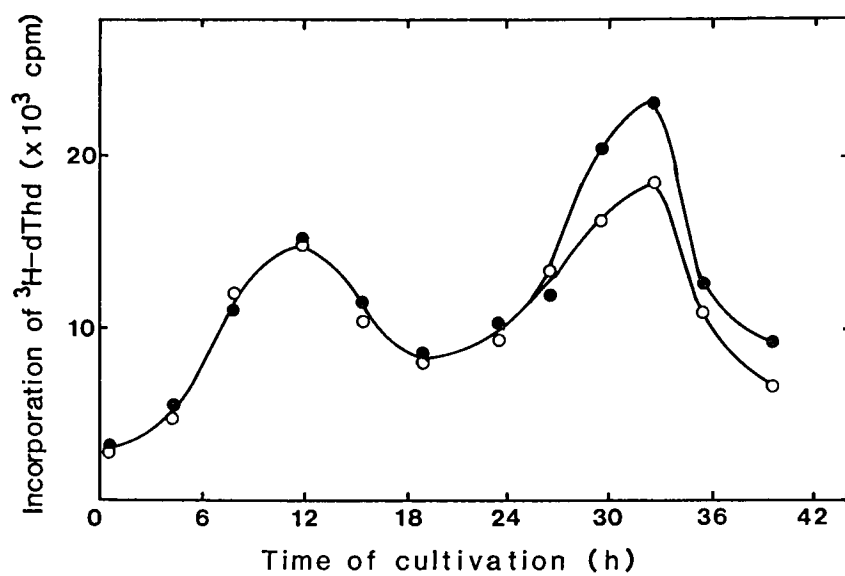


図 6 FCS による DNA 合成の促進と抗 IFN- $\beta$  抗体の影響

図 5 と同様に DNA 合成量を  $^3\text{H}$ -dThd の取り込み量で調べた。グラフの記号も図 5 と同じである。

## 第二部 Autocrine IFN の作用

通常、IFN の効果を調べる場合、培養細胞や動物個体に外から IFN を投与する。しかし、最近いくつかの培養細胞系で生産された IFN が産生細胞それ自身やごく近傍の細胞に作用する例があることが示された(131,132,178-180)。分泌性の作用因子の作用様式が産生細胞と標的細胞が同一である場合を autocrine と呼ぶ。第 I 部で述べた増殖因子による 2-5A 合成酵素の誘導は autocrine IFN- $\beta$  の作用と見なすことができる。HeLa S3 細胞およびマウス L205 細胞で行った autocrine IFN の作用についての知見を以下に示す。

### 1 増殖刺激によって HeLa S3 細胞の生産する IFN- $\beta$ の効果

血清飢餓操作を行った HeLa S3 細胞に FCS やインスリンを添加した場合、どの程度の量の IFN- $\beta$  が誘導されるのかを検討した。すでに表 2 で示したように培養上清には IFN 活性が検出されなかった。そこで、ヒト IFN- $\beta$  に対する特異的なプローブ DNA (6) を用いて誘導される IFN- $\beta$  の mRNA をノーザン法で解析した。図 7 にその結果を示す。対照として 10  $\mu\text{g/ml}$  の poly I:C と 100  $\mu\text{g/ml}$  の DEAE-デキストランで処理し IFN- $\beta$  を誘導した HeLa S3 細胞から抽出した RNA を用いた。対照細胞で培養液中に生産された IFN 活性は 200 IU/ml であった。対照細胞の RNA には 5  $\mu\text{g}$  でも 1.0 kb の大きさの IFN- $\beta$  mRNA が検出された。しかし、FCS やインスリンで誘導した HeLa S3 細胞から抽出した RNA の場合は 30  $\mu\text{g}$  でも相当するバンドは全く検出されなかった。図 7 の下のパネルに同じ検体でのオートラジオグラフィの露出時間を 8 倍に延長した結果を示したが、やはり FCS、インスリンで処理した検体から抽出した RNA

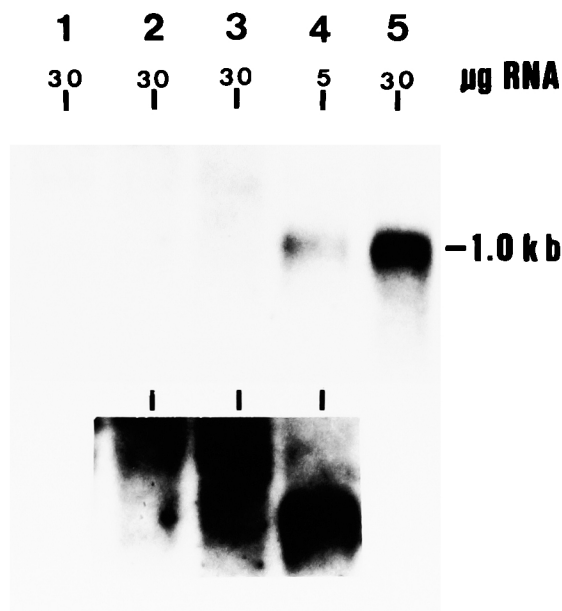


図7 FCS、インスリンで誘導したHeLa S3 細胞でのIFN- $\beta$  mRNA の検出

血清飢餓操作を行ったHeLa S3 細胞を無処理（レーン1）、もしくは5% FCS（レーン2）、20  $\mu\text{g/ml}$  インスリン（レーン3）、10  $\mu\text{g/ml}$  poly I:C と100  $\mu\text{g/ml}$  DEAE-デキストラン（レーン4、5）で誘導し、16 時間後にRNA を抽出した。30  $\mu\text{g}$  のRNA（レーン4は5  $\mu\text{g}$ ）を用いて材料と方法に示すようにノーザン解析を行った。上のパネルではオートラジオグラフィの露出を1日間行った。下のパネルは8日間の露出の結果である。

にはIFN- $\beta$  のシグナルは全く検出されなかった。これらのことからFCS、あるいはインスリンの添加によって血清飢餓操作を行ったHeLa S3 細胞の生産するIFN- $\beta$  は極めて少量であることが示唆された。

HeLa S3 細胞がごく少量のIFN- $\beta$  に反応して2-5A 合成酵素を誘導したことから、細胞のIFNに対する感受性が血清飢餓操作によって高くなった可能性がある。図8に血清飢餓操作を行ったとき



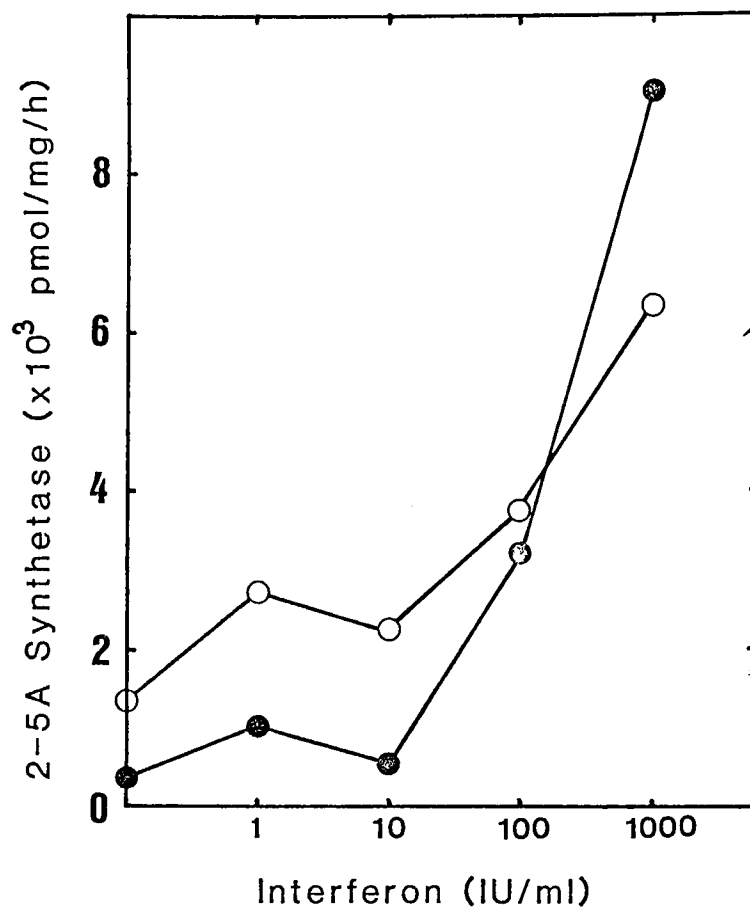


図8 HeLa S3細胞のIFN感受性に対する血清飢餓操作の影響  
血清飢餓操作を行った(○) HeLa S3細胞と、行わなかったHeLa S3細胞(●)を横軸に示した濃度のIFN- $\beta$ で処理し、24時間後に2-5A合成酵素の活性を測定した。

と行わなかったときでのHeLa S3細胞のIFN感受性を2-5A合成酵素の誘導で調べた結果を示した。血清飢餓操作を行った場合には、非誘導時での2-5A合成酵素レベルが増殖中の細胞に比べて高くなっているが、いずれの場合でも100 IU/mlのIFN- $\beta$ を加えて初めて有意に2-5A合成酵素レベルの増大が認められた。このことから、

HeLa S3 細胞は血清飢餓操作によって IFN に対して感受性が高くなったわけではないと結論できる。

これまで解析してきた HeLa S3 細胞の系は生産細胞と標的細胞が同一なので、IFN の作用を autocrine 作用と見なすことができる。今までの結果から解釈すると、autocrine IFN の作用はたとえ生産量が少なくても十分な効果があると解釈しなければならない。この点について、HeLa S3 細胞、およびマウス L205 細胞で IFN に対する中和抗体や蛋白合成阻害剤を用いて autocrine IFN の効果を抑制しようと試みた実験の結果を以下に示した。

## 2 2-5A 合成酵素 mRNA 誘導に対するサイクロヘキシイミドの効果

HeLa S3 細胞に poly I:C と DEAE-デキストランを加えると IFN- $\beta$  が誘導されるが同時に 2-5A 合成酵素の誘導も認められる。この場合、後者の誘導は前者の誘導の結果である。そこでサイクロヘキシイミドを用いて細胞の蛋白合成を阻害し、IFN の生産を抑制した場合、2-5A 合成酵素 mRNA の誘導がどのように影響を受けるかを調べた。用いたサイクロヘキシイミドの濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で細胞の蛋白合成量は 99% 以上抑制される (データ省略)。

図 9 に 2 種のヒト 2-5A 合成酵素 mRNA に共通な部分を持つ cDNA をプローブとして用いて行ったノーザン解析の結果を示す。poly I:C と DEAE-デキストランで処理すると、結果第一部 3 に示した 3.6 kb、3.2 kb、1.6-1.8 kb の 3 種類のバンドが検出される。サイクロヘキシイミドの存在下ではこれらの RNA の誘導は抑制されず、かえって増強された。蛋白質合成阻害剤による mRNA の誘導促進効果は遺伝子発現の抑制蛋白質の合成が阻害された結果、mRNA が蓄積したと解釈されている (163)。サイクロヘキシイミド存在

下での 2-5A 合成酵素 mRNA の誘導が IFN- $\beta$  の作用によることは、それが抗 IFN- $\beta$  抗体を加えることによってほぼ完全に抑制されることから示された。すなわち、サイクロヘキシイミドを用いて細胞の蛋白質合成量を 99% 抑制した場合のごく少量生産される autocrine

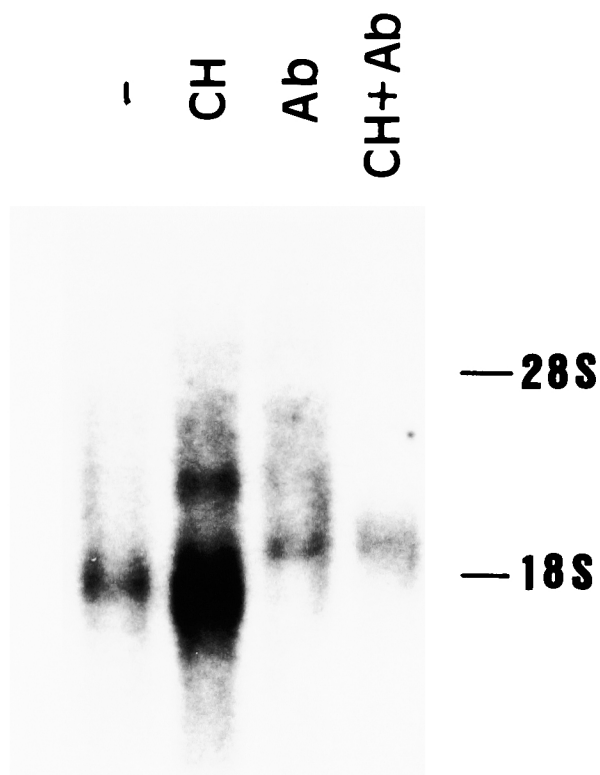


図9 Poly I:C による 2-5A 合成酵素の誘導に対するサイクロヘキシイミドおよび抗 IFN- $\beta$  抗体の影響

HeLa S3 細胞を 10  $\mu\text{g/ml}$  poly I:C と 100  $\mu\text{g/ml}$  DEAE-デキストランで処理し、16 時間後に細胞から RNA を抽出した。プローブ DNA は 1.6 kb、1.8 kb mRNA に共通な部分を含むので、両方の mRNA が検出される。パネルの右側には 1.8 S (1.9 kb)、2.8 S (4.6 kb) リボゾーム RNA のアガロースゲル上での位置を示した。- : 抗体、薬剤無処理。CH : 100  $\mu\text{g/ml}$  サイクロヘキシイミド処理。Ab : 抗 IFN- $\beta$  抗体処理。CH+Ab : サイクロヘキシイミドと抗 IFN- $\beta$  抗体を処理。抗体濃度は原液の 1,000 分の 1 である。

IFN- $\beta$  によって 2-5A 合成酵素 mRNA の誘導は十分であると考えられる。

### 3 IFN の autocrine 作用に対する抗 IFN 抗体の抑制効果

HeLa S3 細胞と同様にマウス L205 細胞を poly I:C と DEAE-デキストランで処理し、IFN を誘導した。同時に 2-5A 合成酵素も

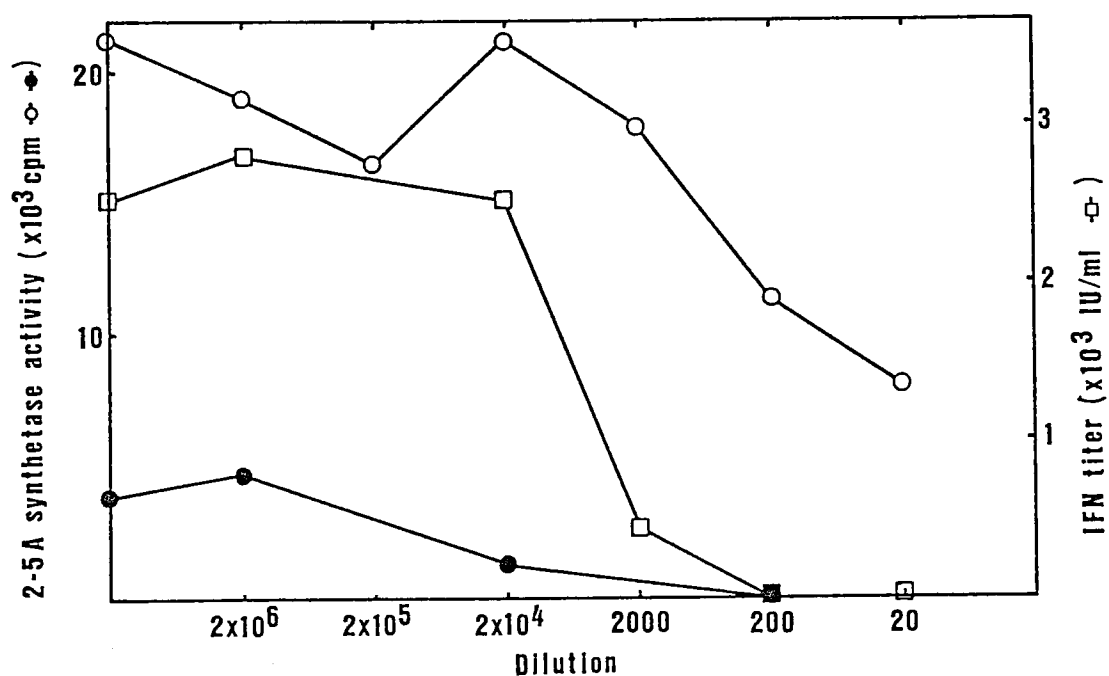


図10 L205 細胞での 2-5A 合成酵素の誘導に対する抗 IFN- $\beta$  抗体の影響。  
L205 細胞を 10  $\mu$ g/ml poly I:C と 100  $\mu$ g/ml DEAE-デキストランで処理し、20 時間後に 2-5A 合成酵素の活性および培養上清中の IFN 活性を測定した。横軸は誘導開始時に加えた抗マウス IFN- $\alpha$  /  $\beta$  抗体の希釈の逆数を示している。(○) : poly I:C と DEAE-デキストランで誘導される 2-5A 合成酵素の値。(●) : 200 IU/ml のマウス IFN- $\beta$  で誘導される 2-5A 合成酵素の値。(□) : poly I:C と DEAE-デキストランで誘導したときの培養上清中の IFN 活性。

誘導される。誘導剤の添加と同時に種々の濃度の抗 IFN- $\alpha$  /  $\beta$  抗血清を培養液に加えて 20 時間培養し、培養上清中の IFN 活性および細胞内の 2-5A 合成酵素レベルを調べた（図 10）。

対照実験として 200 IU/ml のマウス IFN- $\beta$  で誘導した場合での抗 IFN 血清の影響を調べた。抗血清の力価は 2,000 分の 1 希釈で 500 IU/ml の IFN 活性を中和するので、外から加えた 200 IU/ml の効果はこの濃度で見られなくなる。一方、poly I:C と DEAE-デキストランで誘導した場合、抗血清を加えなかった場合には培養上清中には 2500 IU/ml の IFN 活性が検出され、高レベルの 2-5A 合成酵素活性が誘導された。上清中の IFN 活性は 5,000 IU/ml の IFN 活性を中和する抗体濃度（200 分の 1 希釈）で認められなくなったが、依然高い 2-5A 合成酵素活性が誘導された。2-5A 合成酵素活性の半減はさらに抗血清の濃度を 10 倍にしてはじめて得られた。これらの結果から IFN の autocrine 作用の効果は、たとえ培養上清中に IFN 活性が認められなくても十分な効果を発揮すると考えられる。

### 第三部 IFN- $\gamma$ 低感受性細胞の性質

IFN に限らず、種々の生物活性を分子レベルで解析する場合に目的とする生物活性を欠失した突然変異体を用いることは有効な手段である。IFN 作用の突然変異細胞株が数多く分離され解析されている(33,34,53,55,57,133-147)。なかでもマウス白血病細胞由来の L1210 細胞の IFN- $\alpha$  /  $\beta$  感受性株 S、非感受性株 R は最もよく解析されている(33,34,134-136,146)。これらの細胞株は IFN- $\gamma$  に対しては感受性であると報告された(135,136)が、筆者が入手した L1210 S 細胞株は IFN- $\gamma$  に対して感受性が低下していることを見いだした。そこで、この L1210 S 細胞を L1210 Sg 細胞と名付け、IFN- $\gamma$  感受性株 L1210m と性質を比較した。その結果、L1210 Sg 細胞の低感受性の原因は細胞に結合した IFN- $\gamma$  の細胞内侵入・分解の低下と関連があると思われた。

#### 1 L1210 細胞株の IFN- $\gamma$ の抗ウイルス作用に対する感受性

L1210 Sg および L1210m 細胞で VSV に対する抗ウイルス状態の成立にどの程度の IFN が必要かを調べた。VSV の増殖はウイルス RNA の合成量を指標に測定した(図 11)。

L1210 Sg 細胞において VSV-RNA 合成量を半減させるのに必要な IFN- $\gamma$  の濃度は  $5 \times 10^3$  IU/ml であった。一方、L1210m 細胞では 10 IU/ml の IFN- $\gamma$  処理で VSV-RNA 合成量の半減が見られた。すなわち L1210 Sg 細胞は抗ウイルス効果を成立させるのに L1210m 細胞の 500 倍の IFN- $\gamma$  が必要なので、IFN- $\gamma$  に対して低感受性株であると考えられる。一方、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  処理ではほとんど同じ濃度(10 IU/ml)で L1210 Sg 細胞、L1210m 細胞の両方で VSV の

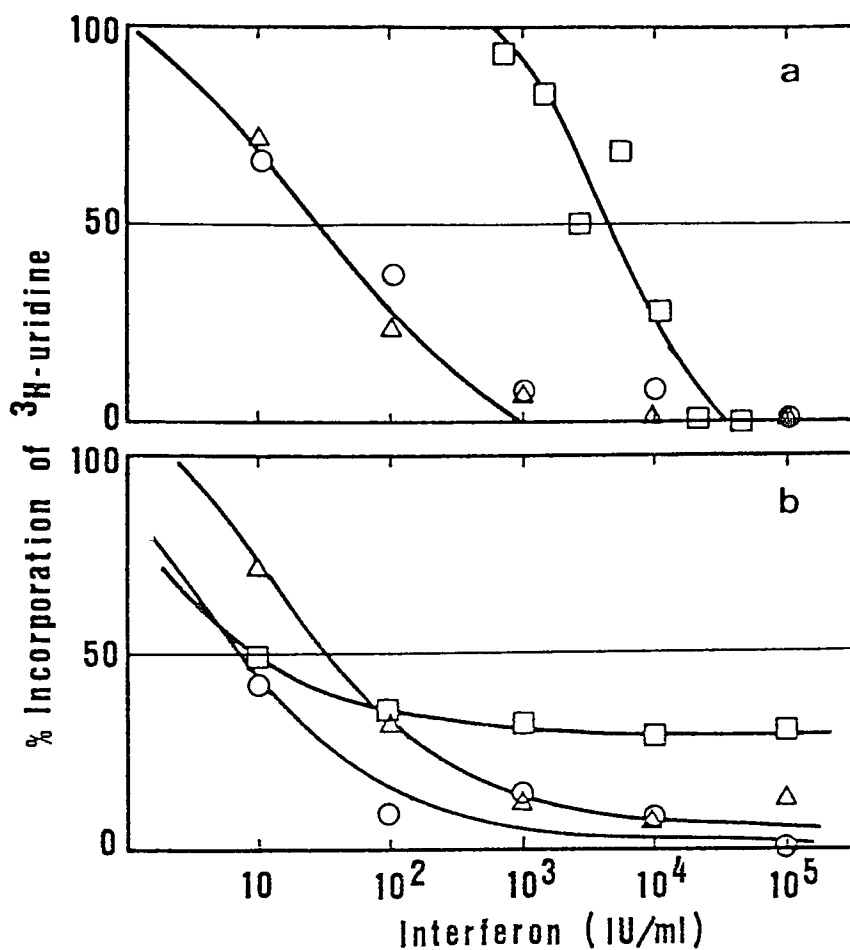


図11 L1210 細胞株のIFN の抗ウイルス作用に対する感受性。  
L1210 Sg 細胞 (a)、L1210m 細胞 (b) を12 時間、横軸に示した濃度のIFN- $\alpha$  (○)、IFN- $\beta$  (△)、IFN- $\gamma$  (□) で処理し、材料と方法に示した手順にしたがってVSV のRNA 合成量を測定した。縦軸はIFN 処理を行っていない細胞でのVSV-RNA 合成量を100% として表示した。

増殖が50% 抑制された。

## 2 細胞増殖阻害効果及び2-5A 合成酵素の誘導

IFN のL1210 Sg、L1210m 細胞の細胞増殖の抑制作用に対する感受性を調べた結果を図12 に示す。L1210 Sg、L1210m 両細胞を

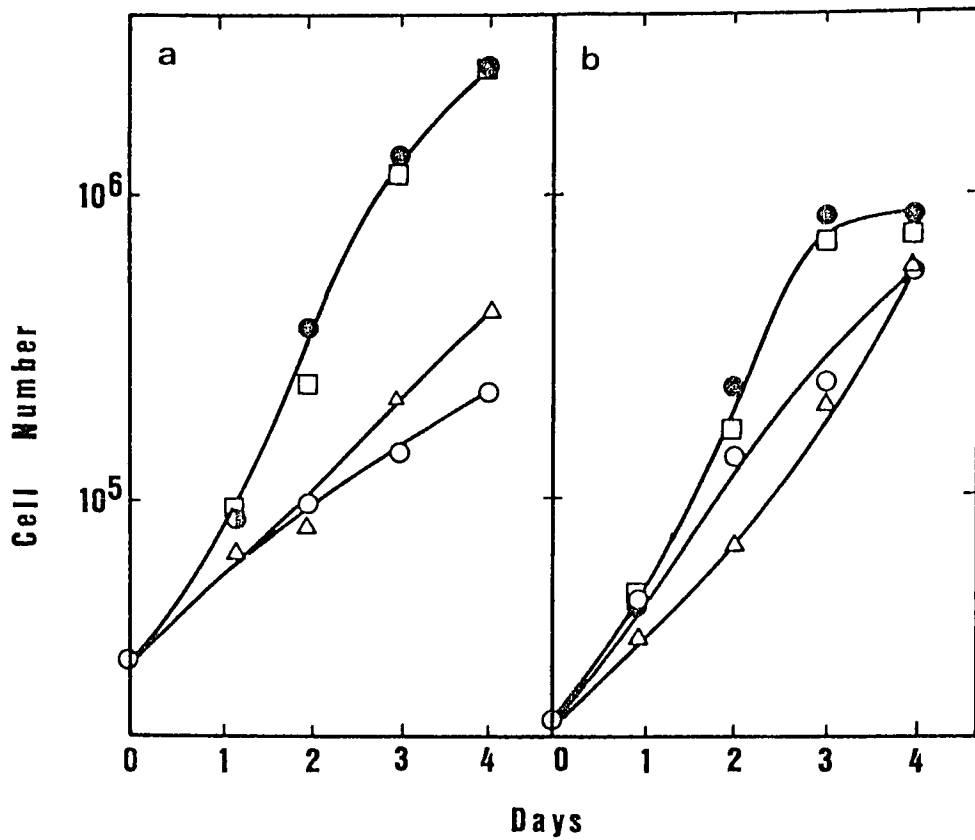


図12 L1210 細胞株の IFN の細胞増殖阻害効果に対する感受性。

初濃度  $2 \times 10^4$  /ml の L1210 Sg 細胞 (a)、L1210m 細胞 (b) を 1 ml の増殖培地で培養し、細胞数をコールターカウンターで算定した。IFN 無添加 (●)、IFN- $\alpha$  (○)、IFN- $\beta$  (△)、IFN- $\gamma$  (□) 存在下。用いた IFN 濃度は  $10^5$  IU/ml である。

$10^5$  IU/ml の各 IFN の存在下で培養し、IFN を加えなかった場合と比較した。IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  を処理することで増殖が抑制されたが、IFN- $\gamma$  ではどちらの細胞にも効果が見られなかった。

次に、IFN による 2-5A 合成酵素の誘導に関して検討した (図 13)。L1210 Sg、L1210m 両細胞を IFN- $\beta$  で処理したときは 2-5A 合成酵素の誘導が顕著であったが、IFN- $\gamma$  ではどちらの細胞でも 2-5A 合成酵素の誘導は見られなかった。この結果から L1210



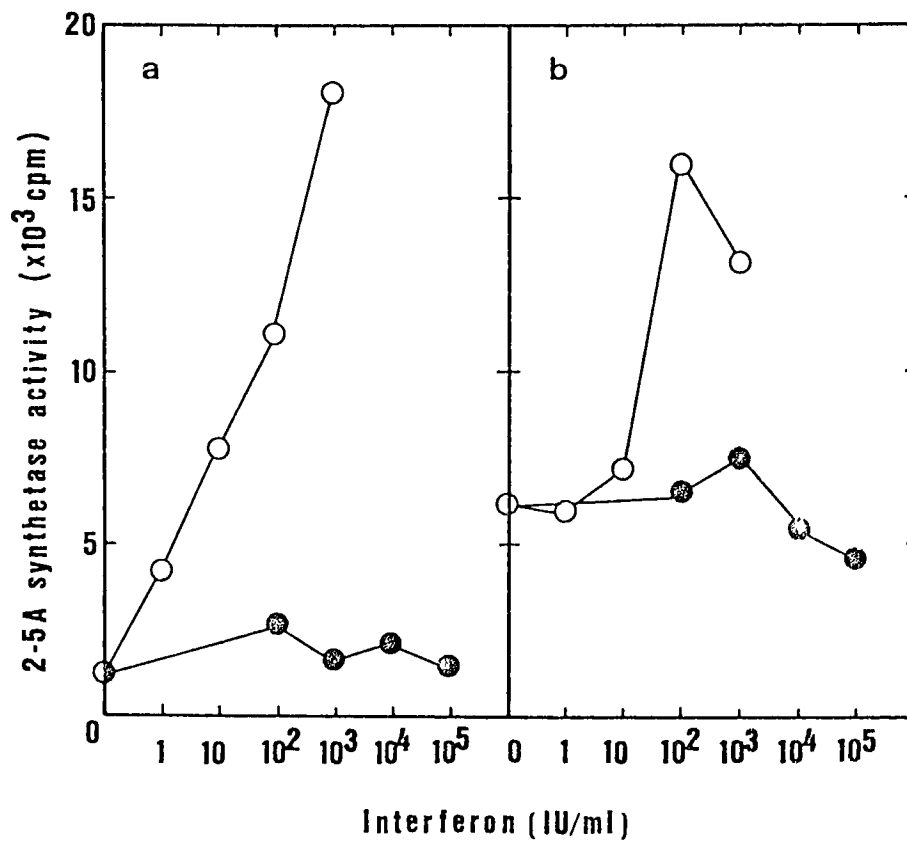


図13 IFNによる2-5A合成酵素の誘導。  
L1210 Sg細胞 (a)、L1210m細胞 (b)を12時間IFN- $\beta$  (○)もしくはIFN- $\gamma$  (●)で処理し2-5A合成酵素の活性を測定した。

Sg および L1210m 細胞においては IFN- $\gamma$  による抗ウイルス状態の誘導には 2-5A 合成酵素が関与していない可能性が示唆される。ただし、L1210m 細胞は L1210 Sg 細胞に比べて高い 2-5A 合成酵素活性を構成的に発現していた。

### 3 IFN のレセプター

次に、これらの細胞での IFN- $\gamma$  に対する感受性の違いが IFN- $\gamma$  のレセプターの性質となんらかの関連があるかを調べた。IFN レセプターの性状の解析には  $^{125}\text{I}$  標識した IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  を用いた。

図 14 に細胞あたりの結合部位数、その解離定数 (dissociation constant:  $K_d$ ) を Scatchard の式 (159) にしたがって調べた

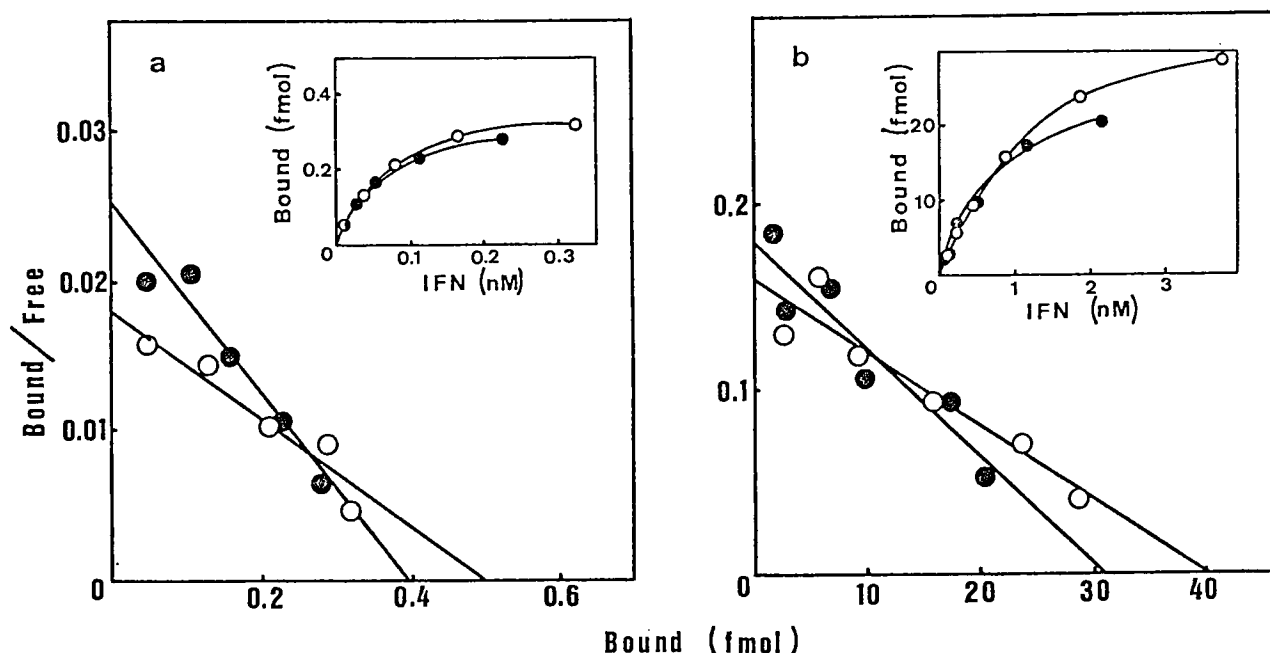


図 14 20 °C での Scatchard 解析 (159)

L1210 Sg 細胞 (○)、L1210m 細胞 (●) を種々の濃度の標識 IFN- $\beta$  (a)、IFN- $\gamma$  (b) と混合し、IFN- $\beta$  の場合は 3 時間、IFN- $\gamma$  の場合は 5 時間 20 °C で保温した。材料と方法に示した手順にしたがって細胞に対する特異的結合量 (bound) を求めた結果を挿入図中に示した。非結合 IFN 量 (Free) は加えた IFN 量から結合 IFN 量を差し引いて求めた。Bound、Free の値をもとに、Scatchard の式 (159) にしたがってプロットし、最小二乗法で近似直線を引いた。相関係数はいずれのグラフも 0.9 以上であった。グラフの横軸との交点から細胞あたりのレセプター数を、グラフの傾きから解離定数を計算した。用いた細胞数は以下のとおりである。L1210m 細胞は IFN- $\beta$  に対して  $1.4 \times 10^4$ 、IFN- $\gamma$  に対して  $1.0 \times 10^6$ 。L1210 Sg 細胞は両 IFN に対して  $2.0 \times 10^6$ 。

結果を示す。細胞における IFN の細胞内侵入や分解を抑制するため、20°C で結合実験を行った。L1210 Sg 細胞は細胞 1 個あたり 12,000 の IFN- $\gamma$  の結合部位を持ち、その Kd は  $0.6 \times 10^{-9}$  M であった。一方、L1210m 細胞では 19,000 の結合部位を有し、Kd は  $0.9 \times 10^{-9}$  M であった。これらの違いはせいぜい数倍であり、2 つの L1210 細胞株が IFN- $\gamma$  の抗ウイルス作用に対して感受性が 500 倍違っていることを説明できない。

一方、IFN- $\beta$  の結合部位に関しては、L1210 Sg 細胞が細胞あたり 145、Kd が  $0.8 \times 10^{-10}$  M であり、L1210m 細胞では 165、Kd が  $1.3 \times 10^{-10}$  M であった。これらの測定値は両者が IFN- $\beta$  に対しておなじ感受性を持つことと一致した。

結合した IFN- $\beta$  および IFN- $\gamma$  は生理的溫度、37°C で細胞内に侵入し分解されるのでそれについて検討した。図 15 に示すように、結合した IFN- $\beta$  の量は L1210 Sg および L1210m 細胞で最初は増加し、30-120 分後にピークに達した後速やかに低値に下がった。L1210m 細胞を標識 IFN- $\gamma$  と培養した場合にもおなじ変化が見られた。ところが、L1210 Sg 細胞では結合量の増加は速いが、減少はほとんど見られなかった。

ここで見られた経時変化は細胞に結合した IFN 分子が細胞内に取り込まれて結合量が増加し、その後分解されて細胞外に放出された結果、結合量が減少すると考えられる(164)。おそらく、L1210 Sg と L1210m 細胞の IFN- $\gamma$  に対する感受性の違いは IFN- $\gamma$  の細胞内侵入や分解の活性に関係があると思われる。

#### 4 L1210 Rg 細胞での IFN レセプター

L1210 Rg 細胞は L1210 Sg 細胞と同時に分離された I 型 IFN に対

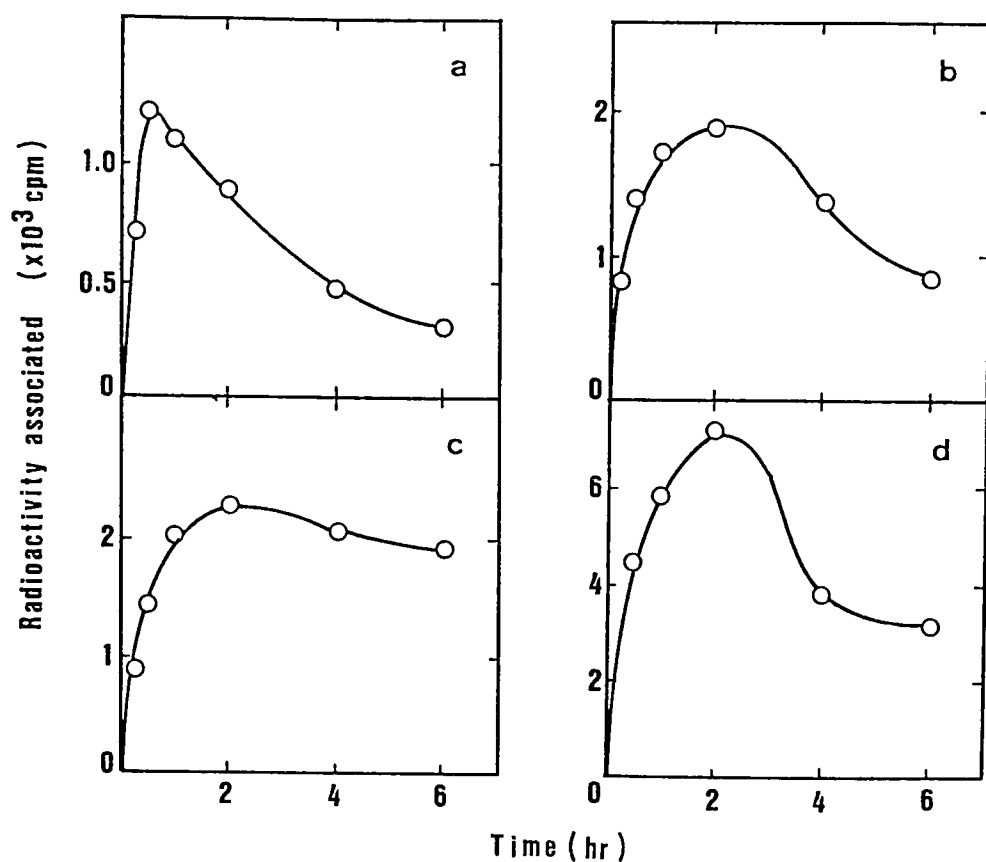


図15 37°CでのL1210細胞に対する結合IFN量の経時変化

L1210 Sg細胞 (a、c)、L1210m細胞 (b、d) を37°Cで $2.5 \times 10^4$  cpmの標識IFN- $\beta$  (a、b)、IFN- $\gamma$  (c、d)と混合し、細胞に対する特異的結合量を経時的に測定した。

する非感受性細胞株である(134)。IFN- $\beta$ のL1210 Rg細胞に対する作用とIFN- $\beta$ の結合に関してL1210 SgおよびL1210m細胞と比較して表7に示す。L1210 Rg細胞は、IFN- $\beta$ の抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用に対して全く感受性を示さなかった。さらに

表7 L1210 Rg 細胞の IFN- $\beta$  に対する感受性

	antiviral (IU/ml) <sup>a</sup>	anti-cell growth (ratio) <sup>b</sup>	binding (cpm) <sup>c</sup>
L1210 Rg	>10 <sup>6</sup>	1.0	20
L1210 Sg	30	0.2	580
L1210m	30	0.3	510

a VSV-RNA 合成量を半減するのに必要な IFN 濃度

b 10<sup>5</sup> IU/ml の IFN 存在下で培養し、3 日後に細胞数を測定し、IFN 未処理の細胞の細胞数に対する比で表した。

c 各細胞を 10<sup>5</sup> cpm の標識 IFN と混合し、4 時間後に細胞に対する結合量を測定した。

IFN- $\beta$  の特異的な結合はほとんど見られず、この細胞の非感受性の原因は IFN- $\beta$  に対するレセプターが欠損しているためと解釈される。

また、L1210 Rg 細胞は IFN- $\gamma$  の抗ウイルス作用に対して L1210 Sg 細胞と同様低い感受性を示した。また 37°C での IFN- $\gamma$  の細胞に対する結合量の経時変化も L1210 Sg 細胞と同じで、ピークに達した後、あまり減少しなかった（データ省略）。

## 考 察

### 1 IFN および 2-5A 合成酵素による細胞増殖の調節

細胞増殖は増殖促進因子と抑制因子によって同時に制御されるというモデルが提案されている(165)。このモデルでは以下の様に傷の治癒を説明する。皮膚に傷ができると増殖促進因子が分泌される。傷の周辺の細胞は普段は増殖していないが、増殖因子によって増殖を開始する。そして、傷が治癒すると増殖抑制因子が作用して細胞の増殖が停止する。一方、このモデルは細胞の腫瘍を細胞の増殖抑制からの逸脱や、増殖因子の自己産生による無限増殖能の獲得であると見なしている。実際、腫瘍細胞の多くが増殖因子を分泌していること、また、発ガン遺伝子で形質転換した細胞は増殖因子を分泌するようになることが確かめられている(160, 161)。一方、抑制因子の方はあまり同定が進んでいない(166-168)。IFN は細胞増殖の抑制作用を持つ(171)ことから、IFN はこの仮説的な増殖抑制因子の一つではないだろうか。これまでに培養細胞が細胞周期に応じてIFNを分泌し、自己制御を行っていることを示す相異なる2つの場合が知られている。1つは細胞が増殖を停止したときで、もう1つは細胞増殖を刺激したときである。

培養細胞がコンフルエントの状態になると増殖が抑制される。この現象は細胞増殖の接触阻害とよばれるが、その場合に働く調節因子についてはほとんど判っていない(166)。2-5A 合成酵素はコンフルエントになった種々の細胞で誘導される(169)。また、肝臓が再生されるとき肝細胞の2-5A 合成酵素のレベルは低下するが、再生終了後、元のレベルに回復する(170)。このような観察結果から2-5A 合成酵素は細胞の接触阻害において増殖抑制に作用して

いると考えられている(171)。同様に、細胞を低濃度の血清をふくむ培地に移して培養し、その増殖が低下する 2-5A 合成酵素レベルが上昇する(172)。しかしながら、細胞が増殖を停止させるときに必ず 2-5A 合成酵素が誘導されるわけではない。本実験で用いた HeLa S3 細胞では血清飢餓操作によっても 2-5A 合成酵素のレベルは上昇しなかった(図 2)。コンフルエントの状態では 2-5A 合成酵素活性が上昇する細胞(L205 細胞、マウス C127 細胞)と、上昇しない細胞(HeLa S3 細胞、L929 細胞)とが存在する(宗川、藤原未発表)。

一方、細胞増殖を促進したとき 2-5A 合成酵素や IFN が誘導されることが報告された(131,132,173-175)。誘導された IFN を抗 IFN 抗体で中和すると細胞増殖がさらに増強されることから、このような IFN の役割は細胞増殖のフィードバック阻害効果だと見なされている。

今までの報告では増殖刺激で誘導される IFN や 2-5A 合成酵素が細胞周期をどのように調節しているかについて解析がなかったので、本研究では HeLa S3 細胞を血清飢餓状態にして細胞周期を同調させ、DNA 合成の経時変化を測定した。結果第一部で述べたように、増殖促進刺激によって誘導される 2-5A 合成酵素のレベルは 18-24 時間後にピークになった(図 2、図 3)。また、DNA 合成は 12 時間後と 32 時間後にピークになった(図 5、図 6)。これらの時間的な関係をまとめたのが図 16 である。抗 IFN- $\beta$  抗体を添加すると 2-5A 合成酵素のピーク以前の DNA 合成は影響されなかったが、それ以後では有意に増強された(図 6)。すなわち、細胞増殖刺激と同時に IFN、2-5A 合成酵素が誘導されるが、その細胞周期における DNA 合成はなんら影響を受けず、むしろ次の細胞周期

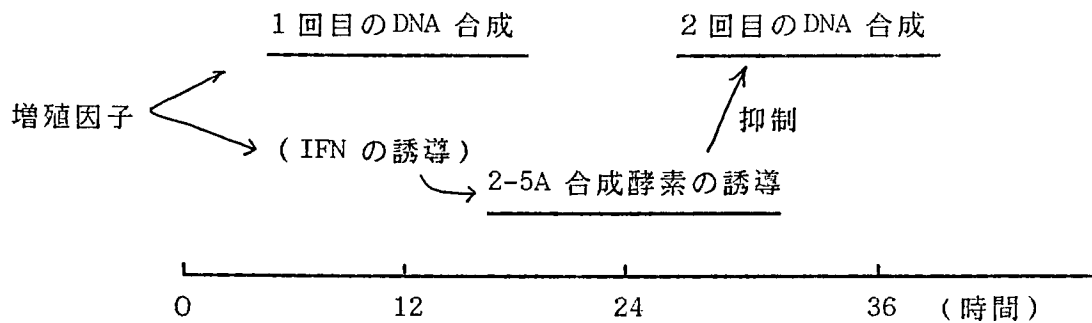


図16 増殖因子によって誘導される2-5A合成酵素と細胞周期の関係  
 は本研究の結果から示されたおよその時間を示している。

でのDNA合成を抑制すると考えられる。HeLa S3細胞では、増殖因子の作用によって細胞の増殖が促進されると同時に増殖を抑制する機構－IFNやそれによって誘導される2-5Aシステム－もが駆動され、全体として細胞増殖が調節され则认为られる。

IFN遺伝子が活性化されてから2-5A合成酵素蛋白質が合成されるまでの多くの過程を考えると、1回目のDNA合成が終了したのちIFNが誘導され、2-5A合成酵素が誘導された可能性は低い。言い替えれば、IFNはDNA合成の結果、もしくはDNA量の増加などによって誘導されたのではないだろう。すると、増殖刺激で誘導されるIFN、2-5A合成酵素のDNA合成抑制作用はいわゆる最終生成物によるフィードバック制御と見なすことはできないことになる。

## 2 増殖因子によるIFNの誘導

結果第一部で血清飢餓操作を行ったHeLa S3細胞にFCS、PDGF、EGF、インスリンなど、増殖を刺激する因子を加えると2-5A合成酵



素が誘導されることを明らかにした。ここで見られた 2-5A 合成酵素の生産は増殖因子によって誘導されたとく微量の autocrine IFN- $\beta$  の作用を介していた。IFN- $\gamma$  の場合は T 細胞増殖因子や分裂誘起物質などの刺激を受けて、T リンパ球が生産する (24-27, 176, 177)。IFN- $\alpha$ 、 $\beta$  は PDGF (131) やコロニー形成刺激因子 (132) によって誘導されるという例が報告されている。また、血球細胞は分化誘導因子の刺激によって IFN- $\alpha$  と  $\beta$  を生産する (178-180)。

増殖因子や分化誘導因子はどのような機構によって IFN を誘導するのだろうか。序論 1 で述べたように、ウイルスを感染させた細胞内で実際に IFN 誘導物質として働くのは dsRNA と考えられている (23)。一方、Balb/c-3T3 細胞においては、PDGF によって誘導される遺伝子群が dsRNA を加えても発現される (131)。実際に dsRNA はヒト繊維芽細胞の増殖を促進した (175)。これらの結果から、増殖因子および dsRNA は細胞増殖促進と IFN の誘導の両作用を有することが示唆される。この 2 つの作用はそれぞれ独立に機能するかもしれないが、細胞内の mRNA や hnRNA が dsRNA 構造を取り得る可能性 (88, 89) を考えると、増殖因子が細胞に作用するとなんらかの dsRNA が形成され、それが IFN 遺伝子を活性化したり細胞周期を駆動するのかもしれない。

最近の真核生物の遺伝子発現調節機構の研究では、遺伝子発現を直接制御する因子を同定する試みがなされている。ヒト IFN- $\alpha$ 、 $\beta$  に関しても遺伝子の上流域に存在する発現に必要な塩基配列が同定され (181-185)、さらにその塩基配列に結合する因子も同定されつつある (184)。一方、PDGF 処理の直後に誘導される遺伝子群の発現機構も解明されつつある (186-189)。近い将来、増殖因子に

よって活性化される遺伝子制御機構や IFN 遺伝子の活性化機構が分子レベルで解明され、両者の関係が明らかにされるであろう。

マウス 3T3 細胞での研究から増殖因子は機能上から 3 つのクラスに分けられている (112-114)。これによると PDGF、EGF などは単独処理でも DNA 合成を刺激する増殖因子であり、前者は細胞周期の G<sub>0</sub> 期から G<sub>1</sub> 期への移行を、後者は G<sub>1</sub> 期から S 期への移行に関与する。一方、インスリンは広い意味での増殖因子であるが、それ自身では DNA 合成を促進せず、他の増殖因子と協同的に働いてその作用を高める。表 6 に示したようにインスリンは Balb/c-3T3 細胞でも NR-6 細胞でも DNA 合成を促進しなかった。ところが、HeLa S3 細胞ではインスリンを処理すると DNA 合成が促進された (図 5)。HeLa S3 細胞は EGF 様の増殖因子を分泌していた (表 6) ことから、インスリンはこの増殖因子の効果を高めたと考えられる。実際、HeLa S3 細胞の無血清培養上清とインスリンを同時に添加することで Balb/c-3T3 細胞の 2-5A 合成酵素の誘導が見られた (表 5) し、また、EGF とインスリンを同時に添加すると、それぞれ単独よりも多量の 2-5A 合成酵素が誘導された (表 2)。

### 3 autocrine IFN の作用

HeLa S3 細胞の増殖は増殖因子で誘導される IFN- $\beta$  によって制御されることが明らかになった。しかしながら、細胞の培養上清中には IFN 活性は検出できず (表 2)、また細胞内に IFN- $\beta$  mRNA も検出できなかった (図 7)。IFN- $\beta$  の関与は特異中和抗体を用いた実験によってのみ示されたものであり、その量は極めて微量と考えられる。HeLa S3 細胞では 2-5A 合成酵素を誘導させるためには 100 IU/ml の IFN- $\beta$  の添加が必要であり、血清飢餓操作を行っ

ても要求される IFN- $\beta$  の濃度は変わらなかった (図 8) 。 細胞増殖因子によって誘導された極めて微量の IFN- $\beta$  でも 2-5A 合成酵素の誘導には十分であったと解釈しなければならない。 同様な結果がマウス骨髄白血病細胞 M1 を分化因子でマクロファージへと分化誘導する系で報告されている。この場合も 2-5A 合成酵素が誘導されたが、培養上清中には IFN 活性は検出できず、僅かの量の IFN が細胞内に検出されたにすぎない (178)。

上記の 2 つの実験系で共通な点は、分泌された IFN が産生細胞を含めすぐ近傍の細胞に作用するというように生産と作用が連動している点である。このような作用の仕方を autocrine 作用と呼ぶ。産生細胞にレセプターがない場合や生産細胞と作用を受ける細胞の種類が異なっている場合を paracrine と呼ぶ。これらの作用様式では分泌された IFN はすぐ近傍のレセプターに結合することになるが、そのため IFN の生産量は少なくても、作用する場での局所的な濃度は十分であるにちがいない。

最近、グルココルチコイド (190) や、レチノイン酸 (191)、神経細胞増殖因子 (192)、腫瘍壊死因子 (193)、PDGF (131) などの生理活性物質が IFN を介さずに 2-5A 合成酵素、抗ウイルス状態を誘導すると報告されている。しかし、これらの報告では autocrine IFN の作用に関しては十分考慮されていないので、IFN が全く関与していないとは結論できないだろう。本報告の結果第二部 2 に示したように、サイクロヘキシイミドを用いてたとえ蛋白質合成を 99% 抑えても 2-5A 合成酵素 mRNA の誘導が見られたが、それは抗 IFN- $\beta$  抗体によって抑制されたことから autocrine IFN- $\beta$  の関与が示唆された。この場合は抗 IFN- $\beta$  抗体によって autocrine IFN- $\beta$  の作用が効果的に抑制されたが、結果第二部 3 に示した L205 細胞

での実験では抗体を作用させるのが必ずしも十分ではないことが示された。L205 細胞に poly I:C で処理して 2-5A 合成酵素を誘導させた場合、IFN に対する抗血清を培養上清中に加え、IFN 活性が検出限界以下に中和されていても、依然高い 2-5A 合成酵素活性が誘導された。Autocrine な IFN の関与を否定するためには蛋白合成阻害剤や抗体を用いて、計算上 IFN が作用するのに必要な濃度以下であったからといって十分ではない。Autocrine IFN の効果が非常に高いことを念頭に入れて厳密な実験を行う必要がある。

#### 4 IFN レセプターと IFN 作用

上の考察 3 で述べた HeLa S3 細胞において autocrine IFN- $\beta$  の作用が培養液中に加えた中和抗体によって抑制されたことから、おそらく IFN- $\beta$  は一旦細胞から分泌されてから作用したと考えられる。一方、PDGF の作用に関しては分泌の途中で PDGF がレセプターに結合して細胞内で作用する可能性が示された(194,195)。本報告の結果第三部には細胞内に侵入した IFN が作用に関与する可能性を示唆する結果を示した。

L1210 S および L1210 R 細胞は Gresser 博士らによって分離された細胞株で、それぞれ I 型 IFN に対して感受性、非感受性であり、これまでに多くの解析がなされ(33,34,134-136,146)、L1210 R 細胞は I 型 IFN に対するレセプターを欠損していることが明らかにされている(33)。L1210 S、R 細胞は IFN- $\gamma$  に対して感受性を有すると報告されていた(135,136)が、本実験で用いたそれらの細胞株は IFN- $\gamma$  に対する感受性が著しく低下していた。おそらく自然突然変異の結果であろう。

そこで IFN- $\gamma$  に対して感受性を有する L1210 細胞を本学理学部

の村松博士から入手し、種々の IFN 作用に関して比較検討した。  
本報告では Gresser 博士から入手した L1210 細胞を L1210 Sg、  
L1210 Rg と称し、村松博士から入手した L1210 細胞を L1210m と称  
した。結果第三部では L1210 Sg と L1210m 細胞での解析結果を中  
心に述べたが、L1210 Rg 細胞でも IFN- $\gamma$  の作用に関して同様な結  
果が得られた。

抗ウイルス作用で調べると L1210 Sg 細胞は L1210m 細胞に比べ  
て IFN- $\gamma$  に対する感受性が 1 / 500 程度と低かった (図 11)。  
しかし、IFN- $\gamma$  は両細胞の細胞増殖には全く影響を与えなかった  
(図 12)。従来、IFN- $\gamma$  は IFN- $\alpha$  や  $\beta$  に比べて抗細胞増殖活性  
が高いとされていたが、リンパ細胞では逆に低くなっているよう  
である (140)。一方、2-5A 合成酵素は IFN の作用に必須と考えられ  
ている (64, 73, 74) が、どちらの細胞でも IFN- $\gamma$  によって 2-5A 合成  
酵素は誘導されなかった (図 13)。

L1210 Sg および L1210m 細胞で IFN- $\gamma$  の結合を調べたところ、  
レセプター数、解離定数では両者に差がなかった (図 14)。し  
かしながら細胞に結合した IFN- $\gamma$  量の経時変化を調べると明らかな  
差が見られた (図 15)。L1210m 細胞では結合量が 30 分後にピー  
クになり、その後すぐに減少した。一方、L1210 Sg 細胞では、  
結合量の減少は少なかった。ここで見られた経時変化は、IFN 分  
子が細胞に結合して内に取り込まれて結合量が増加し、その後、分  
解されて細胞外に放出された結果、結合量が減少する経過を表すと  
考えられる (164)。L1210 Sg 細胞が IFN- $\gamma$  の抗ウイルス作用に対  
して低感受性なのは、細胞内侵入・分解と関連があると思われる。  
EGF の作用に関しても、EGF の細胞への結合量の時間変化は本研究  
で観察したのと同じ形になり、減少量と細胞の反応性が相関するこ

とが報告されている(196)。L1210 Sg 細胞で見られた IFN- $\gamma$  の結合量の経時変化はレセプターの再利用もしくは合成速度が L1210m 細胞のそれよりも速い場合にも観察される。細胞内侵入・分解による結合量の減少が、新たなレセプターの細胞表面への出現で補償されるためである。しかしながら、レセプターの再利用もしくは合成速度が作用と相関関係が認められる蛋白性ホルモンはまだ報告されていない。

これまでも IFN 分子の細胞内侵入や分解がその作用発現に必須であるとの指摘がなされている。IFN 分子を細菌性毒素の結合サブユニットに結合させると IFN レセプターを介さずに細胞内に取り込まれる。この複合蛋白質を細胞に作用させると抗ウイルス状態を誘導させることができた(47)。また、細胞内侵入や分解を抑制する薬剤(197)を作用させた細胞では IFN の抗ウイルス作用が見られなくなる(39,46,49,51)。さらに、IFN- $\gamma$  遺伝子からシグナルペプチド部分を削除して、細胞内で発現させた場合でも細胞は抗ウイルス状態になった。シグナルペプチドは細胞外への分泌に必須であることから細胞内で IFN- $\gamma$  が作用したはずである(52)。

これらの報告とは逆に IFN は細胞表面に結合して作用すると主張する報告もある。IFN をセファロースビーズに結合させ、細胞内に取り込まれないようにして作用させてもその効果は見られた(45)。しかし、この種の実験ではビーズに結合した分子が遊離する可能性が示されている(198)。また、IFN 分子や IFN に対する抗体を直接細胞内に注入してもそれらの効果は観察されなかった(48,50)。しかしながら、IFN は細胞内に小胞の形で取り込まれるので、そのような作用部位に正しく注入されたかという疑問が残る。細胞内での分解を抑える薬剤(51)や、細胞内に取り込む装

置である細胞骨格を脱重合させる薬剤を用いた実験(37)から、IFNの細胞内侵入・分解と2-5A合成酵素の誘導は無関係であるが抗ウイルス状態には必要であるという主張(51)もある。

IFN分子が細胞内に侵入して作用するとしても、細胞内のどの部位で作用するかは不明である。マウス細胞の核にはIFN- $\beta$ の特異的な結合部位が存在すると報告されている(36)が、この結合部位とIFN作用の関係は不明である。IFNが特定の遺伝子を発現させる場合、IFN自身かその分解物が遺伝子の制御部位に結合して直接活性化、抑制を行うのであれば、細胞表面(レセプター)であれ、細胞内の小胞であれ、細胞のどこかで情報の変換・伝達が行われなければならない。IFNの細胞内侵入・分解が遺伝子発現の調節に関与することを確認するためには、遺伝子誘導の試験管内での再構成系を開発しなければならないだろう。

今までのIFNレセプターに関する研究はIFNの特異的結合をもとにした解析が主体であった。この方法で定義されたレセプターは、作用とは無関係に単に結合部位を示すだけである。しかし、レセプター数(145)や結合定数(199)とIFN感受性との相関、また、特異的結合量とIFN効果との相関(34)から、特異的結合部位として定義されたレセプターがIFNの作用を細胞内に仲介すると間接的に推察されているにすぎない。IFNに対するレセプターが存在しなければその作用が見られないことは本報告の表8に示したL1210 Rg細胞での解析結果からも明らかである(33)。

現在、レセプター分子の精製が進行している(30)。それによってIFNの遺伝子の発現誘導機構に対するレセプターの役割が明らかにされ、結合能を持つが作用を細胞内に伝達しないレセプター(141)や本研究のL1210 Sg細胞のレセプターのように、細胞内侵

入・分解活性が低い分子の分子的な欠陥が明らかにされるだろう。

情報分子は作用した後速やかに環境から除かれ、いつまでも作用が持続しないことが必要である。細胞内侵入・分解は情報分子としての役割に対しても重要と考えられている。この過程の結果、細胞表面上のレセプター数の一時的な減少が伴う。IFN は生体に投与されると速やかに代謝され、血流から除かれるが、この細胞内侵入・分解の過程も一役買っているであろう。

## 5 2-5A 合成酵素と抗ウイルス作用

2-5A 合成酵素は IFN 作用に必須な酵素であると考えられている(64,73,74)。ところが、L1210m 細胞では IFN- $\gamma$  によって 2-5A 合成酵素が誘導されなかったにもかかわらず、抗ウイルス状態になった(図 11、図 12)。おそらく、2-5A 合成酵素は IFN- $\gamma$  による抗ウイルス状態には貢献していないものと思われる。

それでは、2-5A 合成酵素は IFN によって誘導される抗ウイルス状態にどれほどの寄与をしているのだろうか。マウス胚性腫瘍細胞では IFN 処理によって 2-5A 合成酵素が誘導されるにもかかわらず、dsRNA 依存性蛋白質リン酸化酵素は誘導されない(200)。この細胞では IFN は最も単純な構造を持った RNA ウイルス、ピコルナウイルスに対して有効な抗ウイルス状態を誘導するだけで、そのほかのウイルスの増殖は抑制されない(201)。また、2-5A システムの構成員である RNase L が欠損している突然変異細胞は抗ウイルス状態にならない(137)。最近、遺伝子工学的手法を用いて 2-5A 合成酵素だけを発現する細胞が作製され、その細胞で種々のウイルスの増殖が調べられた(202)。その結果、そのような細胞ではピコルナウイルスの増殖は抑制されるが、VSV の増殖は影響を



受けなかった。したがって、ピコルナウイルスの増殖は2-5A 合成酵素の作用によって阻害されるが、VSV のようなウイルスの増殖は2-5A 合成酵素以外の機構が必要であると考えられる。前述のマウス胚性腫瘍細胞での結果では、ピコルナウイルス以外のウイルスの増殖を抑制するには2-5A 合成酵素以外にdsRNA 依存性蛋白質リン酸化酵素も同時に関与する必要があるのかも知れない。

ウイルスによってはIFN の阻害効果に対して感受性を持たないもの(203)もあり、また、二重鎖RNA 依存性蛋白質リン酸化酵素を阻害する仕組みを持ったウイルスもある(204)。細胞とウイルスの組み合わせによって発揮されるIFN の抗ウイルス作用は異なっていて(205-208)、ただ1つの機構でIFN の抗ウイルス効果を説明できない。実際、2-5A 合成酵素が誘導されるが、抗ウイルス状態にならない突然変異株が分離されている(139,142)。今後、2-5A 合成酵素や、そのほかの2-5A システムの構成員をそれぞれ独立に発現するような細胞を作製することによって、IFN の抗ウイルス作用に対する2-5A システムの寄与をより厳密に位置づけることができるであろう。

## 6 IFN の生体内での作用

近年、遺伝子組み換えの技術を利用してIFN の大量生産が可能になった。また、抗IFN 抗体を結合させたカラムや高速液体クロマトグラフィーなどを用いた有効で簡便な精製法も開発された。現在、IFN はウイルス感染症(209)や癌の治療(210)などに応用されはじめている。IFN の臨床投与が広く行われるに従って、今まであまり研究が進んでいなかった生体内でのIFN の作用や、生理的な役割が重視されるようになった。

今までのところ、生体内にはごく微量な IFN が生産されていることが示されている。生体内での IFN の作用は、炎症の場合 (211)、ウイルス感染が起こっている局所 (212) など、限定された部位で起こっていると考えられる。そこでは IFN は生産細胞のすぐ近傍の細胞や生産細胞自身に作用する、すなわち autocrine、もしくは paracrine に作用すると考えられる (211)。そのほかにも正常な個体で高い 2-5A 合成酵素レベルが検出されたり (213,214)、生体から分離した細胞が抗ウイルス状態であったり (215)、IFN を分泌していたりする (216)。

生体内では少量の IFN で十分な効果を発揮しているとするれば、なんらかの方法で IFN の挙動を調べなければならない。本報告では 2-5A 合成酵素の挙動を調べることで HeLa S3 細胞の増殖制御をごく微量の autocrine IFN- $\beta$  が行っていることを示した。2-5A 合成酵素の触媒する反応の生成物は特異性が高く、IFN によって誘導されるほかの酵素よりも高感度で検出できる。2-5A 合成酵素の活性を指標にすれば、生体内で微量に生産されている IFN の作用を調べることができるであろう。

IFN は細胞の分化にも影響を与えることが示されている。骨髄芽球からマクロファージや多型核白血球の分化する場合は促進作用 (217)、また、阻害作用として筋芽細胞から筋肉細胞への分化 (218,219)、赤芽細胞が赤血球に分化する場合 (100,220)、黒色素芽細胞から黒色素細胞に分化する場合 (221)、繊維芽細胞が脂肪細胞に分化の阻害 (222) などが上げられる。骨髄芽細胞や赤芽球の分化の場合には IFN が分泌され、細胞増殖の制御に関与していると考えられている (180)。この場合でも、本研究と同様、autocrine IFN の作用は外から加えた場合とは異なっていた。autocrine

IFN は細胞の分化誘導にも作用すると思われる。

細胞増殖抑制作用や免疫調節作用から、IFN は抗腫瘍効果があると考えられている。HeLa S3 細胞はヒト子宮頸部癌由来の細胞(223)で、もともと IFN 生産量が少なく、また、IFN に対する感受性も低い(133,224)。癌細胞でも IFN が実際に増殖制御に関与している一例が示された訳であるが、IFN システムが細胞増殖の抑制機構として不全なために HeLa S3 細胞が癌化したのかについてはもっと定量的な解析が必要である。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜りました京大ウイルス研究所、川出由己先生、宗川吉汪先生、渡部好彦先生に厚くお礼申し上げます。また、増殖因子や細胞を快く提供して下さり、御指導してくださいました岐阜市立薬科大学、河野通明先生、遺伝子組換え技術の手法に関し丁寧な指導と適切な討論をして下さりました京大ウイルス研究所の福永理己郎先生に感謝申し上げます。また、L1210 S、L1210 R 細胞を恵与してくださいましたフランス癌研究所の I. Gresser 博士、L1210 細胞を供与してくださいました本学理学部村松繁先生、マウス IFN- $\gamma$  を提供してくださいました塩野義製薬研究所の皆様にお礼申し上げます。最後にいつも暖かい励ましの言葉を下さいました京都人文学院の長井大先生、京大ウイルス研究所血清免疫部門の富山朔二先生、並びに細胞ウイルス部門の皆様にご心からお礼申し上げます。

## 文 献

1. Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 147. 258-267
2. Iwakura, Y., Yonehara, S., & Kawade, Y. (1978) Purification of mouse L cell interferon. Essentially pure preparations with associated cell growth inhibitory activity. J. Biol. Chem. 253. 5074-5079
3. Kawakita, M., Cabrer, B., Taira, H., Bebello, M., Slattery, E., Weideli, H., & Lengyel, P. (1978) Purification of interferon from mouse Ehrlich ascites tumor cells. J. Biol. Chem. 253. 598-602
4. Secher, D.S., & Burk, D.C. (1980) A monoclonal antibody for large scale purification of human leukocyte interferon. Nature(London) 285. 446-450
5. Yip, Y.K., Barrowclough, B.S., Urban, C., & Vilček, J. (1982) Purification of two subspecies of human  $\gamma$  (immune) interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79. 1820-1824
6. Taniguchi, T., Ohno, S., Fujii-Kuriyama, Y., & Muramatsu, M. (1980) The nucleotide sequence of human fibroblast interferon cDNA. Gene 10. 11-15
7. Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, I., Streuli, M., Ecdosi, J., Boll, W., Cantell, K., & Weissmann, C. (1980) Synthesis in *E. coli* of a peptide with human leukocyte activity. Nature(London) 284. 316-320
8. Nagata, S., Mantei, N., & Weissmann, C. (1980) The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon- $\alpha$ . Nature(London) 287. 401-408
9. Gray, P.W., & Goeddel, D.V. (1982) Structure of the human immune interferon gene. Nature(London) 293. 859-863
10. Trent, J.M., Olson, S., & Lawn, R.M. (1982) Chromosomal location of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of *in situ* hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79. 7809-7813
11. Gray, W.P., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J., Wallace, D.M., Berger, S.L., Levinson, A.D., & Goeddel, D.V. (1982) Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. Nature(London) 295. 503-508
12. Shaw, G.D., Boll, W., Taira, H., Mantei, N., Lengel, P., & Weissmann, C. (1983) Structure and expression of cloned murine IFN- $\alpha$  genes. Nuc. Acids Res. 11. 555-573
13. Gray, P.W., & Goeddel, D.V. (1983) Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80. 5842-5846

14. Higashi, Y., Sokawa, Y., Watanabe, Y., Kawade, Y., Ohno, S., Takaoka, C., & Taniguchi, T. (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for mouse interferon- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 258. 9522-9529
15. The Interferon Nomenclature Committee. (1984) Interferon nomenclature. *J. Gen. Virol.* 65. 669-670
16. Kawade, Y. (1987) The interferon system in the mouse. *in* The interferon system. A current review to 1987. pp169-175. (Eds. Baron, S., Dianzani, F., Stanton, G.J., & Fleischmann, W.R.Jr.) University of Texas Press Austin
17. Taniguchi, T., Mantei, N., Schwarzstein, M., Nagata, S., Muramatsu, M., & Weissmann, C. (1980) Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature (London)* 285. 547-549
18. Merlin, G., Falcoff, E., & Aguet, M. (1985)  $^{125}$ I-labelled human interferons alpha, beta and gamma: comparative receptor-binding data. *J. Gen. Virol.* 66. 1149-1152
19. Vignaux, F., & Gresser, I. (1977) Differential effects of interferon in the expression of H-2K, H-2D, and Ia antigens on mouse lymphocytes. *J. Immunol.* 118. 721-723
20. Weil, J., Epstein, C.J., & Epstein, L.B. (1983) A unique set of polypeptides is induced by  $\gamma$  interferon in addition to those induced in common with  $\alpha$  and  $\beta$  interferons. *Nature (London)* 301. 437-439
21. Samuel, C.E., & Knutson, G.S. (1983) Mechanism of interferon action: human leukocyte and immune interferon regulate the expression of different genes and induce different antiviral states in human amnion U cells. *Virology.* 130. 474-484
22. Ho, M. (1984) Induction and inducers of interferon. *in* Interferon 1: general and applied aspects. pp79-124 (Ed. Billiau, A.) Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam
23. Marcus, P.I. (1983) Interferon induction by Viruses: one molecule of dsRNA as the threshold for interferon induction. *Interferon* 5. 115-180
24. Wheelock, E.F. (1965) Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149. 310-311
25. Green, J.A., Cooperband, S.R., & Kibrick, S. (1969) Immune-specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes. *Science* 164. 1415-1417
26. Tomida, M., Yamamoto, Y., Hozumi, M., & Kawade, Y. (1982) Interferon production in mixed cultures of mouse spleen cells and tumor cells: IFN-gamma as the main component. *J. Interferon Res.* 2. 271-283
27. Ito, Y., Shimokata, K., & Maeno, K. (1982) Gamma interferon production in allogeneic stimulation: antigenicity that is sufficient to cause interferon production. *Infect. Immun.* 37. 427-431

28. Rinderknecht, E., O'Connor, B.H., & Rodriguez, H. (1984) Natural human interferon- $\gamma$ . Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J. Biol. Chem.* 259. 6790-6797
29. Joshi, A.R., Sakar, F.H., & Gupta, S.L. (1982) Interferon receptors. Cross-linking of human leukocyte interferon  $\alpha$ -2 to its receptor on human cells. *J. Biol. Chem.* 257. 13884-13887
30. Aguet, M., & Merlin, G. (1987) Purification of human  $\gamma$  interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal anti-receptor antibodies and human  $\gamma$  interferon. *J. Exp. Med.* 165. 988-999
31. Radke, K.L., Colby, C., Kates, J.R., Krider, H.M., & Prescott, D.M. (1974) Establishment and maintenance of the interferon-induced antiviral state: studies in enucleated cells. *J. Virol.* 13. 623-630
32. Young, C.S.H., Pringle, C.R., & Follett, A.C. (1975) Action of interferon in enucleated cells. *J. Virol.* 15. 428-429
33. Aguet, M. (1980) High-affinity binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled mouse interferon to a specific cell surface receptor. *Nature (London)* 284. 459-461
34. Aguet, M., & Blanchard, B. (1981) High affinity binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled mouse interferon to a specific cell surface receptor. II. Analysis of binding properties. *Virology* 115. 249-261
35. Zoon, K.C., Arnheiter, H., Nedden, D.Z., Fitzgerald, D.J.P., & Willingham, M.C. (1983) Human interferon alpha enters cells by receptor-mediated endocytosis. *Virology*. 130. 195-203
36. Kushnaryov, V.M., MacDonald, H.S., Sedmak, J.J., & Grossberg, S.E. (1985) Murine interferon- $\beta$  receptor-mediated endocytosis and nuclear membrane binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82. 3281-3285
37. Branca, A.A., Faltynek, C.R., D'Alessandro, S.B., & Baglioni, C. (1982) Interaction of interferon with cellular receptors. Internalization and degradation of cell-bound interferon. *J. Biol. Chem.* 257. 13291-13296
38. Branca, A.A., & Baglioni, C. (1982) Down-regulation of the interferon receptor. *J. Biol. Chem.* 257. 13197-13200
39. Yonehara, S., Ishii, A., & Yonehara-Takahasi, M. (1983) Cell surface receptor-mediated internalization of interferon: its relation to the antiviral activity of interferon. *J. Gen. Virol.* 64. 2409-2418
40. Anderson, P., & Vilček, J. (1983) Human interferon- $\gamma$  is internalized and degraded by cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 258. 6497-6502
41. Sarker, F.H., & Gupta, S.L. (1984) Interferon receptor interaction. Internalization of interferon  $\alpha$  2 and modulation of its receptor on human cells. *Eur. J. Biochem.* 140. 461-467
42. King, A.C., & Cuatrecasas, P. (1981) Peptide hormone-induced receptor

- mobility, aggregation, and internalization. *New Eng. J. Med.* 305. 77-88
43. Pastan, I.H., & Willingham, M.C. (1981) Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells. *Ann. Rev. Physiol.* 43. 239-250
  44. Goldfine, I.D. (1981) Interaction of insulin, polypeptide hormones, and growth factors with intracellular membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 650. 53-67
  45. Ankel, H., Chany, C., Galliot, B., Chevalier, M.J., & Robert, M. (1973) Antiviral effect of interferon covalently bound to sepharose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70. 2360-2363
  46. Commoey-Chevalier, M.J., Robert-Galliot, B., & Chany, C. (1978) Effect of ammonium salts on the interferon-induced antiviral state in mouse L cells. *J. Gen. Virol.* 41. 541-547
  47. Anderson, P., & Vilček, J. (1982) Synthesis and biological characterization of a covalent conjugate between interferon and ricin toxin B chain. *Virology* 123. 457-460
  48. Higashi, Y., & Sokawa, Y. (1982) Microinjection of interferon and 2',5'-oligoadenylate into mouse L cells and their effects on virus growth. *J. Biochem. (Tokyo)* 91. 2021-2028
  49. Anderson, P., Tyco, B., Maxfield, F., & Vilček, J. (1982) Effect of primary amines on interferon action. *Virology* 117. 510-515
  50. Arnheiter, H., & Zoon, K.C. (1984) Microinjection of anti-interferon antibodies into cells does not inhibit the induction of an antiviral state by interferon. *J. Virol.* 52. 284-287
  51. Chelbi-Alix, M.K., & Thang, M.N. (1985) Chloroquine impaires the interferon-induced antiviral state without affecting the 2',5'-oligoadenylate synthetase. *J. Biol. Chem.* 260. 7960-7964
  52. Sancean, J., Sondermyer, P., Beranger, F., Falcoff, R., & Vaquero, C. (1987) Intracellular human  $\gamma$ -interferon triggers an antiviral state in transformed murine L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84. 2906-2910
  53. Dron, M., Tovey, M.G., & Uzé, G. (1986) Isolation of Daudi cells with reduced sensitivity to interferon. IV. Characterization of clones with altered binding of human interferon  $\alpha$  subspecies. *J. Gen. Virol.* 67. 663-669
  54. Kuhry, J.G., Poidron, P., & Laustriat, G. (1983) Evidence for early fluidity changes in the plasma membranes of interferon treated L cells, from fluorescence anisotropy data. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110. 88-95
  55. Schneck, J., Rager-Zisman, B., Rosen, D.M., & Bloom, B.R. (1982) Genetic analysis of the role of cAMP in mediating effects of interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79. 1879-1883
  56. Tovey, M.G., Rochette-Egly, C., & Kolb, J.P. (1982) Interferon enhance-



- ment of natural killer cell cytotoxicity: role of cyclic nucleotides. *J. Interferon Res.* 4. 549-561
57. Nagata, Y., Rosen, O.M., Makmen, M.H., & Bloom, B.R. (1984) Biochemical analysis of mutants of a macrophage cell line resistant to the growth-inhibitory activity of interferon. *J. Cell Biol.* 98. 1342-1347
  58. Becton, D.L., Adams, D.O., & Hamilton, T.A. (1985) Characterization of protein kinase C activity in interferon gamma treated murine peritoneal macrophages. *J. Cellul. Physiol.* 125. 485-491
  59. Celada, A., & Schreiber, R.D. (1986) Role of protein kinase C and intracellular calcium mobilization in the induction of macrophage tumoricidal activity by interferon- $\gamma$ . *J. Immunol.* 137. 2373-2379
  60. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature (London)* 308. 693-698
  61. Takai, Y., Kaibuchi, K., Tsuda, T., & Hoshijima, M. (1985) Role of protein kinase C in transmembrane signaling. *J. Cellul. Biochem.* 29. 143-155
  62. Samuel, C., & Joklik, W.K. (1974) A protein synthesizing system from interferon-treated cells that discriminates between cellular and viral messenger RNAs. *Virology* 58. 476-491
  63. Baxt, B., Sonnabend, J.A., & Bablanian, R. (1977) Effects of interferon on vesicular stomatitis virus transcription and translation. *J. Gen. Virol.* 35. 325-334
  64. Revel, M. (1979) Molecular mechanisms involved in the antiviral effects of interferon. *Interferon.* 1. 101-163
  65. Baglioni, C., DeBenedetti, A., & Williams, G.J. (1984) Cleavage of nascent reovirus mRNA by localized activation of the 2'-5'-oligoadenylate-dependent endoribonuclease. *J. Virol.* 52. 865-871
  66. DeBenedetti, A., Williams, G.J., & Baglioni, C. (1985) Inhibition of binding to initiation complexes of nascent reovirus mRNA by double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 54. 408-413
  67. DeBenedetti, A., Williams, G.J., Comeau, L., & Baglioni, C. (1985) Inhibition of viral mRNA translation in interferon-treated L cells infected with reovirus. *J. Virol.* 55. 588-593
  68. Dobo, G., Scheirer, W., Suh, M., Schultze, B., Horak, I., & Jungwirth, G. (1972) Protein synthesis in pox-infected cells treated with interferon. *Virology* 50. 140-147
  69. Ransohoff, R.M., Maroney, P.A., Nayak, D.P., Chambers, T.M., & Nilsen, T.M. (1985) Effect of human alpha A interferon on influenza virus replication in MDBK cells. *J. Virol.* 56. 1049-1052
  70. Maheshwari, R.K., Demsey, A.E., Mohanty, S.B., & Friedman, R.M. (1980) Interferon-treated cells release vesicular stomatitis virus par-

- ticles lacking glycoprotein spikes: correlation with biochemical data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. 2284-2287
71. Bugany, H., Valerie Bosch, J., Ferdinand, F.J., & Friis, R.R. (1983) Inhibition of Rous sarcoma virus assembly by treatment with 2',5' adenosine nucleotides. *Virology* 127. 290-298
  72. Friedman, R.M., & Ramseur, J.M. (1974) Inhibition of murine leukemia virus production in chronically infected AKR cells: a novel effect of interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71. 3542-3544
  73. Lengyel, P. (1982) Biochemistry of interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* 51. 251-282
  74. Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., & Samuel, C.E. (1987) Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* 56. 727-777
  75. Hovanessian, A.G., Brown, R.E., & Kerr, I.M. (1977) Synthesis of low molecular weight inhibitors of protein synthesis with enzyme from interferon-treated cells. *Nature(London)* 268. 537-540
  76. Dougherty, J.P., Samanta, H., Farrell, P.J., & Lengyel, P. (1980) Interferon, Double-stranded RNA, and RNA degradation. Isolation of homogeneous ppp(2'p5'A)<sub>n-1</sub> synthetase from Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.* 255. 3813-3816
  77. Yang, K., Samanta, H., Dougherty, J., Jayaram, B., Broeze, R., & Lengyel, P. (1981) Interferons, double-stranded RNA, and RNA degradation. Isolation and characterization of homogeneous human (2'-5')(A)<sub>n</sub> synthetase. *J. Biol. Chem.* 256. 9324-9328
  78. Schmidt, A., Zilberstein, A., Shulman, L., Federman, P., Berissi, H., & Revel, M. (1978) Interferon action: isolation of nuclease F, a translation inhibitor activated by interferon-induced (2'-5') oligo-isoadenylate. *FEBS Letters* 95. 257-264
  79. Kerr, I.M., & Brown, R.E. (1978) pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75. 256-260
  80. Minks, M.A., Benveniste, S., Maroney, P.A., & Baglioni, C. (1979) Synthesis of 2'5'-oligo(A) in extracts of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254. 5058-5064
  81. Wreschner, D.H., McCauley, J.W., Skehel, J.J., & Kerr, I.M. (1981) Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)<sub>n</sub>A-dependent ribonuclease. *Nature(London)* 289. 414-417
  82. Schmidt, A., Chernajovsky, Y., Shulman, L., Federman, P., Berissi, H., & Revel, M. (1979) An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2',5')oligoadenylate and the C-C-A terminus of tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76. 4788-4792
  83. Levin, D., & London, I.M. (1978) Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylate eukaryotic initiation factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 75. 1121-1125

84. Levin, D.L., Petryshyn, R., & London, I.M. (1980) Characterization of double-stranded-RNA-activated kinase that phosphorylates  $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 $\alpha$ ) in reticulocyte lysates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. 832-836
85. Zilberstein, A., Federman, P., Shulman, L., & Revel, M. (1976) Specific phosphorylation in vitro of a protein associated with ribosomes of interferon-treated mouse L cells. *FEBS Letters* 68. 119-124
86. Content, J., Lebleu, B., Nudel, U., Zilberstein, A., Berssi, H., & Revel, M. (1975) Blocks in elongation and initiation of protein synthesis induced by interferon treatment in mouse L cells. *Eur. J. Biochem.* 54. 1-10
87. Thomas, J.R., & Wagner, R.R. (1982) Evidence that vesicular stomatitis virus produces double-stranded RNA that inhibits protein synthesis in a reticulocyte lysate. *J. Virol.* 44. 189-198
88. Nilsen, T.W., Maroney, P.A., Robertson, H.D., & Baglioni, C. (1982) Heterogeneous nuclear RNA promotes synthesis of (2',5')-oligoadenylate and is cleaved by the (2',5')oligoadenylate-activated endoribonuclease. *Molec. Cellul. Biol.* 2. 154-160
89. Baum, E.Z., & Ernst, V.G. (1983) Inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates by a double-stranded RNA component in HeLa mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114. 41-49
90. Imanishi, J., Yokota, Y., Kishida, T., Mukainaka, T., & Matsuo, A. (1975) Phagocytosis-enhancing effect of human leukocyte interferon preparation of human peripheral monocyte in vitro. *Acta Virol.* 19. 52-58
91. Roberts, W.K., & Vasil, A. (1982) Evidence for the identity of murine gamma interferon and macrophage activating factor. *J. Interferon Res.* 2. 519-532
92. Celada, A., Gray, P.W., Rinderknecht, E., & Shreiber, R.D. (1984) Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity *J. Exp. Med.* 160. 55-74
93. Trinchieri, G., & Santoli, D. (1978) Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-induced transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J. Exp. Med.* 147. 1314-1333
94. Fellous, M., Nir, V., Wallach, D., Merlin, G., Rubinstein, M., & Revel, M. (1982) Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79. 3082-3086
95. Pober, J.S., Collins, T., Gimbrone, M.A. Jr., Contran, R.S., Gitlin, J.D., Fiers, W., Clayberger, C., Krensky, A.M., Burakoff, S.J., & Reiss, C.S.

- (1983) Lymphocytes recognize human vesicular endothelial and dermal fibroblast Ia antigens induced by recombinant immune interferon. *Nature*(London) 305. 726-729
- 96.Herrmann,F., Cannistra,S.A., Levine,H., & Griffin,J.D. (1985) Expression of interleukin 2 receptors and binding of interleukin 2 by gamma interferon-induced human leukemic and normal monocytic cells. *J. Exp. Med.* 162. 1111-1116
  - 97.Perussia,B., Dayton,E.T., Lazarus,R., Fanning,V., & Trinchieri,G. (1983) Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J. Exp. Med.* 158. 1092-1113
  - 98.Aune,T.M., & Pierce,C.W. (1982) Activation of a suppressor T-cell pathway by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79. 3808-3812
  - 99.DeMaeyer,E., DeMaeyer-Guignard,J., & Vandeputte,M. (1975) Inhibition by interferon of delayed-type hypersensitivity in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72. 1753-1757
  - 100.Klimpel,G.R., Fleishmann,W.R.Jr., & Klimpel,K.D. (1982) Gamma interferon(IFN- $\gamma$ ) and IFN  $\alpha/\beta$  suppress murine myeloid colony formation(CFU-C): magnitude of suppression is dependent upon level of colony-stimulating factor(CSF). *J. Immunol.* 129. 76-80
  - 101.Braun,W., & Levy,H.B. (1972) Interferon preparations as modifiers of immune responses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141. 769-773
  - 102.Gisler,R.H., Lindahl,P., & Gresser,I. (1974) Effect of interferon on antibody synthesis in vitro. *J. Immunol.* 113. 438-444
  - 103.Sonnefield,G., Mandel,A.D., & Merigan,T.C. (1978) Time and dosage dependence of immunoenhancement by murine type II interferon preparation. *Cell. Immunol.* 40. 285-293
  - 104.Kelsey,D.K., Overall,J.C.Jr., & Glasgow,L.A. (1982) Production of alpha and gamma interferons by spleen cells from cytomegalovirus-infected mice. *Infect. Immun.* 36. 651-656
  - 105.Nakane,A., & Minagawa,T. (1983) Alternative induction of alpha/beta interferons and gamma interferon by *Listeria monocytogenes* in mouse spleen cell cultures. *Cellul. Immunol.* 75. 283-291
  - 106.Garotta,G., Talmadge,K.W., Pink,R.L., Dewald,B., & Baggiolini,M. (1986) Functional antagonism between type I and type II interferons on human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140. 948-954
  - 107.Brouty-Boyé,D., & Tovey,M.G. (1978) Inhibition by interferon of thymidine uptake in chemostat cultures of L1210 cells. *Intervirology.* 9. 243-252
  - 108.Gewert,D.R., Shah,S., & Clemens,M.J. (1981) Inhibition of cell division by interferons. Changes in the transport and intracellular metabolism of thymidine in human lymphoblastoid(Daudi) cells. *Eur. J. Biochem.* 116. 487-444

109. Stephanson, M.L., Krane, S.M., Amento, E.P., McCroskery, P.A. & Byrne, M. (1985) Immune interferon inhibits collagen synthesis by rheumatoid synovial cells associated with decreased levels of the procollagen mRNA. *FEBS Letters* 180. 43-49
110. Pfeffer, L.M., Murphy, J.S., & Tamm, I. (1979) Interferon effects on the growth and division of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 121. 111-120
111. Collyn d'Hooghe, M.C., Brouty-Boyé, D., Malaise, E.P., & Gresser, I. (1977) Interferon and cell division. XII. Prolongation by interferon of the intermitotic time of mouse mammary tumour cells in vitro. Microcinematographic analysis. *Exp. Cell Res.* 105. 73-75
112. Stiles, C.D., Capone, G.T., Sher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J., & Pledger, W.J. (1979) Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76. 1279-1283
113. Jimenez de Asua, L., Richmond, K.M.V., Otto, A.M., Kubler, A.M., O'Farrell, M.K., & Rudland, P.S. (1979) Growth factors and hormones interact in a series of temporal steps to regulate the rate of initiation of DNA synthesis in mouse fibroblasts. *in* Hormone and cell culture, Book A (Eds. Sato, G.H., & Ross, R.) pp. 425-439, Cold Spring Havour Laboratory New York
114. Stiles, C.D., Pledger, W.J., Van Wyk, J.J., Antoniades, H., & Scher, C.D. (1979) Hormonal control of early events in the BALB/c-3T3 cell cycle: commitment to DNA synthesis. *ibid.* pp. 403-424
115. Smith, J.A., & Martin, L. (1973) Do cells cycle? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70. 1263-1267
116. Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71. 1286-1290
117. Balkwill, F., & Taylor-Papadimitriou, J. (1978) Interferon affects both G1 and S+G2 in cells stimulated from quiescence to growth. *Nature (London)* 274. 798-800
118. Creasey, A.A., Bartholomew, J.C., & Merigan, T.C. (1980) Role of G0-G1 arrest in the inhibition of tumour cell growth by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. 1471-1475
119. Sokawa, Y., Watanabe, Y., Watanabe, Y., & Kawade, Y. (1977) Interferon suppresses the transition of quiescent 3T3 cells to a growing state. *Nature (London)* 268. 236-238
120. Killander, D., Lindahl, P., Lundin, L., Leary, P. & Gresser, I. (1976) Relationship between the enhanced expression of histocompatibility L1210 antigens on interferon-treated L1210 cells and their position in the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* 6. 56-59
121. Matarese, G.P., & Rossi, G.B. (1977) Effect of interferon on growth and division cycle of Friend erythroleukemic murine cells in

- vitro. J. Cell Biol. 75. 344-354
122. Heyns, A.P., Eldor, A., Vlodavsky, I., Kaiser, N., Friedman, R., & Panet, A. (1985) The antiproliferative effect of interferon and the mitogenic activity of growth factors are independent cell cycle events. Studies with vascular smooth muscle cells and endothelial cells. Exp. Cell Res. 161. 297-306
  123. Ebsworth, N., Rozengurt, E., & Taylor-Papadimitrou, J. (1986) Microtubule-disrupting agents reverse the inhibitory effect of interferon on mitogenesis in 3T3 cells. Exp. Cell Res. 165. 255-259
  124. Creasey, A.A., Eppstein, D.A., Vivienne Marsh, Y., Khan, Z., & Merigan, T.C. (1983) Growth regulation of melanoma cells by interferon and (2'-5') oligoadenylate synthetase. Mol. Cellul. Biol. 3. 780-786
  125. Butt, T.R., & Sreevalsan, T. (1983) Interferon and sodium butylate inhibit the stimulation of poly(ADP-ribose) synthetase in mouse cells stimulated to divide. Exp. Cell Res. 148. 449-459
  126. Sreevalsan, T., Taylor-Papadimitriou, J., & Burchell, J. (1980) Differential effect of interferon on DNA synthesis, 2-deoxyglucose uptake and ornithine decarboxylase activity in 3T3 cells stimulated by polypeptide growth factors and tumour promoters. J. Cellul. Physiol. 104. 1-9
  127. Einat, M., Resnitzky, D., & Kimchi, A. (1984) Close link between reduction of c-myc expression by interferon and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest. Nature (London) 313. 531-532
  128. Jonak, G.J., & Knight, E. Jr. (1984) Selective reduction of c-myc mRNA in Daudi cells by human  $\beta$  interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81. 1747-1750
  129. Einat, M., Resnitzky, D., & Kimchi, A. (1985) Inhibitory effects of interferon on the expression of genes regulated by platelet-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82. 7608-7612
  130. Yarden, A., & Kimchi, A. (1986) Tumor necrosis factor reduces c-myc expression and cooperates with interferon- $\gamma$  in HeLa cells. Science 234. 1419-1421
  131. Zullo, J.N., Cochran, B.H., Huang, A.S., & Stiles, C.D. (1985) Platelet-derived growth factor and double-stranded ribonucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. Cell 43. 793-800
  132. Moore, R.N., Larsen, H.S., Horohov, D.W., & Rouse, B.T. (1984) Endogenous regulation of macrophage proliferative expansion by colony-stimulating factor-induced interferon. Science 223. 178-180
  133. Cantell, K., & K. Paucker, K. (1963) Studies on viral interference in two lines of HeLa cells. Virology 19. 81-87
  134. Gresser, I., Bandu, M.T., & Brouty-Boyé, D. (1974) Interferon and cell division. IX. Interferon-resistant L1210 cells: characteristics and origin. J. Natl. Cancer Inst. 52. 553-559

135. Hovanessian, A.G., Bonnardiere, C.L., & Falcoff, E. (1980) Action of murine  $\gamma$  (immune) interferon on  $\beta$  (fibroblast)-interferon resistant L1210 and embryonal carcinoma cells. *J. Interferon Res.* 1. 125-135
136. Ankel, H., Krishnamurti, C., Besancon, F., Stefanos, S., & Falcoff, E. (1980) Mouse fibroblast (type I) and Immune (type II) interferons: pronounced differences in affinity for gangliosides and in antiviral and antigrowth effects on mouse leukemia L-1210R cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. 2528-2532
137. Epstein, D.A., Czarniecki, C.W., Jacobsen, H., Friedman, R.M., & Panet, A. (1981) A mouse cell line, which is unprotected by interferon against lytic virus infection, lacks ribonuclease F activity. *Eur. J. Biochem.* 118. 9-15
138. Vandebussche, P., Divizia, M., Verhaegen-Lewalle, M., Fuse, A., Kuwata, T., DeClercq, E., & Content, J. (1981) Enzymatic activities induced by interferon in human fibroblast cell lines differing in their sensitivity to the anticellular activity of interferon. *Virology* 111. 11-22
139. Silverman, R.H., Balkwill, F.R., Trowsdale, F., & Kerr, S.L. (1982) The ppp(A2'p)nA and protein kinase systems in wild-type and interferon resistant Daudi cells. *Eur. J. Biochem.* 126. 333-341
140. Tomita, Y., Cantell, K., & Kuwata, T. (1982) Effects of human  $\gamma$  interferon on cell growth, replication of virus and induction of 2'-5' oligoadenylate synthetase in three human lymphoblastoid cell lines and K562. *Inter. J. Cancer* 30. 161-165
141. Affabris, E., Romeo, G., Belardelli, F., Jemma, C., Mehti, N., Gresser, I., & Rossi, G.B. (1983) 2-5A synthetase activity does not increase in interferon-resistant Friend leukemia cell variants treated with  $\alpha / \beta$  interferon despite the presence of high-affinity interferon receptor site. *Virology* 125. 508-512
142. Tovey, M.G., Mogensen, K.E., Lebleu, B., Mehti, N., & Begon-Lours-Guymarho, J. (1983) Isolation of Daudi cells with reduced sensitivity to interferon. II. On the mechanisms of resistance. *J. Gen. Virol.* 64. 2649-2653
143. Yonehara, S., Yonehara-Takahasi, M., & Ishii, A. (1983) Binding of human interferon  $\alpha$  to cells of different sensitivities: studies with internally radiolabeled interferon retaining full biological activity. *J. Virol.* 45. 1168-1171
144. Veomett, G., Lahm, B.D., & Hawkins, J. (1983) The interferon-induced hyporesponsive state in variant and parental L cells: a requirement for cell division. *J. Gen. Virol.* 64. 1735-1741
145. Ücer, U., Bartsch, H., Scheurich, P., & Pfizenmaier, K. (1985) Biological effects of  $\gamma$ -interferon on human tumor cells: quantity and

- affinity of cell membrane receptors for  $\gamma$ -IFN in relation to growth inhibition and induction of HLA-DR expression. *Int. J. Cancer*. 36. 103-108
146. Wietzerbin, J., Gaudet, C., Aguet, M., & Falcoff, E. (1986) Binding and cross-linking of recombinant mouse interferon- $\gamma$  to receptors in mouse leukemic L1210 cells: interferon- $\gamma$  internalization and receptor down-regulation. *J. Immunol.* 136. 2451-2455
  147. Besancon, F., Silbermann, F., Dron, M., Tovey, M.G., Thang, M.N., & Bourgeade, M.F. (1987) Relationship between inhibition of cell growth and of transferrin receptor expression by interferon (IFN)  $\alpha$ : studies in IFN-sensitive and IFN-resistant Daudi cells. *J. Gen. Virol.* 68. 2647-2654
  148. Eagle, H. (1959) The specific amino acid requirements of mammalian cells (strain L) in tissue culture. *J. Biol. Chem.* 214. 839
  149. Dulbecco, R., & Freeman, G. (1959) Plaque formation by the polyoma virus. *Virology*. 8. 396-397
  150. Moore, G.E., Gerner, R.E., & Franklin, J.E. (1967) Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* 119. 519-524
  151. Dulbecco, R., & Vogt, M. (1954) Plaque formation and isolation of pure cell lines with poliomyelitis virus. *J. Exp. Med.* 99. 167-182
  152. Earle, W.R., Schilling, E.L., Stark, T.H., Atrous, N.P., Brown, M.F., & Shelton, E. (1943) Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 4. 165-212
  153. Shiojiri, S., Fukunaga, R., Ichii, Y., & Sokawa, Y. (1986) Structure and expression of a cloned cDNA for human (2'-5') oligoadenylate synthetase. *J. Biochem. (Tokyo)* 99. 1455-1464
  154. Nagata, K., Kikuchi, N., Ohara, O., Teraoka, H., Yoshida, N., & Kawade, Y. (1986) Purification and characterization of recombinant murine immune interferon. *FEBS Letters* 205. 200-204
  155. Kawade, Y., & Yamamoto, Y. (1981) Induction and production of L cell interferon. *Meth. Enzymol.* 78. 139-143
  156. Pruss, R.M., & Herschman, H.R. (1977) Variants of 3T3 cells lacking mitogenic response to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74. 3918-3921
  157. Sokawa, J., Shimizu, N., & Sokawa, Y. (1984) Presence of (2'-5') oligoadenylate synthetase in avian erythrocyte. *J. Biochem. (Tokyo)* 96. 215-222
  158. Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York
  159. Scatchard, G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51. 660-672
  160. Todaro, G.J., & DeLarco, J.E. (1978) Growth factors produced by sar-



- coma virus-transformed cells. *Cancer Res.* 38. 4147-4154
161. Sporn, M.B., & Roberts, A.B. (1985) Autocrine growth factors and cancer. *Nature (London)* 313. 745-747
  162. Benech, P., Merlin, G., Revel, M., & Chebath, J. (1985) 3' end structure of the human (2'-5')oligo A synthetase gene: prediction of two distinct proteins with cell type-specific expression. *Nuc. Acids Res.* 13. 1267-1281
  163. Greenberg, M.E., Hermanowski, A.L., & Ziff, E.B. (1986) Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of *c-fos*, *c-myc*, and actin gene transcription. *Molec. Cellul. Biol.* 6. 1050-1057
  164. Carpenter, G., & Cohen, S. (1976) <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 71. 157-171
  165. Bullough, W.S. (1965) Mitotic and functional homeostasis: a speculative review. *Cancer Res.* 25. 1683-1727
  166. Lieberman, M.A., Keller-McGandy, C.E., Woolsey, T.A., & Glaser, L. (1982) Binding of isolated 3T3 surface membranes to growing 3T3 cells and their effect on cell growth. *J. Cellul. Biochem.* 20. 81-93
  167. Wells, V., & Mallucci, L. (1983) Properties of cell growth inhibitor produced by mouse embryo fibroblasts. *J. Cellul. Physiol.* 117. 148-154
  168. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D. F., & Sporn, M.B. (1985) Type  $\beta$  transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82. 119-123
  169. Stark, G.R., Dower, W.J., Schimke, R.T., Brown, R.E. & Kerr, I.M. (1979) 2-5A synthetase: assay, distribution and variation with growth or hormone status. *Nature (London)* 278. 471-473
  170. Smekens-Etienne, M., Goldstein, J., Ooms, H.A. & Dumont, J.E. (1983) Variation of (2'-5')oligo(adenylate) synthetase activity during rat-liver regeneration. *Eur. J. Biochem.* 130. 269-273
  171. Clemens, M.J., & McNurlan, M.A. (1985) Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. *Biochem. J.* 226. 345-360
  172. Krishnan, I., & Baglioni, C. (1981) Elevated level of (2'-5') oligoadenylic acid polymerase activity in growth-arrested human lymphoblastoid Namalva cells. *Mol. Cell. Biol.* 1. 932-938
  173. Vilcek, J., Palombella, V.J., Henriksen-DeStefano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hirai, M., & Tsujimoto, M. (1986) Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 163. 632-643
  174. Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L.T., Vilček, J., & Sehgal, V.

- P.B. (1986) Induction of  $\beta$  2-interferon by tumor necrosis factor: A homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell* 45. 659-666
- 175.Vilcek,J., Kohase,M., & Henriksen-DeStefano,D. (1987) Mitogenic effect of double-stranded RNA in human fibroblasts: Role of autogenous interferon. *J. Cellul. Physiol.* 130. 37-43
- 176.Johnson,H.M., & Torres,B.A. (1982) Phorbol ester replacement of helper cell and interleukin 2 requirement in immune interferon (IFN- $\gamma$ ) production. *Infect. Immun.* 36. 911-914
- 177.Croll,A.D., & Morris,A.G. (1986) The regulation of  $\gamma$ -interferon production by interleukins 1 and 2. *Cellul. Immunol.* 102. 33-42
- 178.Sokawa,Y., Nagata,K., & Ichikawa,Y. (1981) Induction and function of 2',5'-oligoadenylate synthetase in differentiation of mouse myeloid leukemia cells. *Exp. cell Res.* 135, 191-197
- 179.Friedman-Einat,M., Revel,M. & Kimchi,A. (1982) Initial characterization of a spontaneous interferon secreted during growth and differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 2. 1472-1480
- 180.Resnitzky,D., Yarden,A., Zipori,D. & Kimchi,A. (1986) Autocrine  $\beta$ -related interferon controls *c-myc* suppression and growth arrest during hematopoietic cell differentiation. *Cell* 46. 31-40
- 181.Goodboun,S., Zinn,K., & Maniatis,T. (1985) Human  $\beta$ -interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element. *Cell* 41. 509-520
- 182.Ryals,J., Dierks,P., Ragg,H., & Weissmann,C. (1985) A 46-nucleotide promoter segment from an IFN- $\alpha$  gene renders an unrelated promoter inducible by virus. *Cell* 41. 497-507
- 183.Fujita,T., Ohno,S., Yasumitsu,H., & Taniguchi,T. (1985) Delimitation and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon- $\beta$  gene. *Cell* 41. 489-496
- 184.Zinn,K., & Maniatis,T. (1986) detection of factors that interact with the human  $\beta$ -interferon regulatory region in vivo by DNAase I footprinting. *Cell* 45. 611-618
- 185.Goodbourn,S., Burstein,H., & Maniatis,T. (1986) The human  $\beta$ -interferon gene enhancer is under negative control. *Cell* 45. 601-610
- 186.Cochran,B.H., Reffel,A.C., & Stiles,C.D. (1983) Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 33. 937-947
- 187.Kelly,K., Cochran,B.H., Stiles,C.D., & Leder,P. (1983) Cell-specific regulation of the *c-myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35. 603-610
- 188.Kruijer,W., Cooper,J.A., Hunter,T., & Verma,I.M. (1984) Platelet-

- derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein. *Nature*(London) 312. 711-716
- 189.Muller,R., Bravo,R., & Burckhardt,J. (1984) Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature*(London) 312. 716-720
  - 190.Krishnan,I., & Baglioni,C. (1980) Increased levels of (2'-5') oligo(A) polymerase activity in human lymphoblastoid cells treated with glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. 6506-6510
  - 191.Bourgeade,M.F., & Besançon,F. (1984) Induction of 2',5'-oligo adeny- late synthetase by retinoic acid in two transformed human cell lines. *Cancer Res.* 44. 5355-5360
  - 192.Saama,M., Toots,U., Raukas,E., Zhelkorsky,A., Pivazian,A., & Neuman,T. (1986) Nerve growth factor induced changes in (2'-5')oligo(A) synthetase and 2'-phosphodiesterase activities during differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Exp. Cell Res.* 166. 229-236
  - 193.Mestan,J., Digel,W., Mittnacht,S., Hillen,H., Blohm,D., Moller, A., Jacobsen,H., & Kirchner,H. (1986) Antiviral effects of recombinant tumour necrosis factor *in vitro*. *Nature*(London) 323. 816-819
  - 194.Betsholtz,C., Westermarck,B., Ek,B., & Heldin,C.H. (1984) Coexpres- sion of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in human os- teosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activa- tion. *Cell* 39. 447-457
  - 195.Keating,M.T., & Williams,L.T. (1988) Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in *v-sis*-transformed cells. *Science* 239. 914-916
  - 196.Schaudies,R.P., Harper,R.A., & Savage,C.R.Jr. (1985) <sup>125</sup>I-EGF bind- ing to responsive and nonresponsive cells in culture: loss of cell-associated radioactivity relates to growth induction. *J. Cel- lul. Physiol.* 124. 493-498
  - 197.Dean,R.T., Jessup,W., & Roberts,C.R. (1984) Effects of exogenous amines on mammalian cells, with paticular reference to membrane flow. *Biochem. J.* 217. 27-40
  - 198.Kolb,H.J., Renner,R., Hepp,K.D., Weiss,L., & Wieland,O.H. (1975) Re- evaluation of sepharose-insulin as a tool for the study of insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72. 248-252
  - 199.Yonehara,S., Yonehara-Takahasi,M., Ishii,A., & Nagata,S. (1983) Dif- ferent binding of human interferon  $\alpha$  1 and  $\alpha$  2 to common receptors on human and bovine cells. Studies with recombinant interferons produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 258. 9046-9049
  - 200.Wood,J.N., & Hovanessian,A.G. (1979) Interferon enhances 2-5A syn- thetase in embryonal carcinoma cells. *Nature*(London) 282. 74-77
  - 201.Nilsen,T.W., Wood,D.L., & Baglioni,C. (1980) Virus-specific effects

- of interferon in embryonal carcinoma cells. *Nature*(London) 286. 178-179
202. Chebath, J., Benech, P., Revel, M., & Vigneron, M. (1987) Constitutive expression of (2'-5')oligo A synthetase confers resistance to picornavirus infection. *Nature*(London) 330. 587-588
  203. Youngner, J., Thacore, H. & Kelly, M. (1972) Sensitivity of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid viruses to different species of interferon in cell culture. *J. Virol.* 10. 171-181
  204. Katze, M.G., Decorato, D., Safer, B., Galabru, J., & Hovanessian, A.G. (1987) Adenovirus VAI RNA complexes with the 68000 Mr protein kinase to regulate its autophosphorylation and activity. *EMBO J.* 6. 689-697
  205. Czarniecki, C.W., Sreevalsan, T., Friedman, R.M., & Panet, A. (1981) Dissociation of interferon effects on murine leukemia virus and encepharomyocarditis virus replication in mouse cells. *J. Virol.* 37. 827-831
  206. Paez, E., & Esteban, M. (1985) Interferon prevents the generation of spontaneous deletion at the left terminus of vaccinia virus DNA. *J. Virol.* 56. 75-84
  207. Rose, J.M., Crowley, C.K., & Fleischmann, Jr. W.R. (1985) Evidence that IFN- $\alpha$  /  $\beta$  induces two antiviral states active against different viruses. *J. Gen. Virol.* 66. 1153-1158
  208. Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., & Weissmann, C. (1986) Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with clone Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44. 147-158
  209. Peters, M., Davis, G.L., Dooley, J.S., & Hoofhagle, J.H. (1986) The interferon system in acute and chronic viral hepatitis. *Prog. liver Dis.* 8. 453-467
  210. Strander, H. (1986) Interferon treatment of human neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 46.
  211. Bocci, V. (1985) The physiological interferon response. *Immunol. Today.* 6. 7-9
  212. Sokawa, Y., Ando, T., & Ishihara, Y. (1980) Induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase and interferon in mouse trigeminal ganglia infected with herpes simplex virus. *Infect. Immun.* 28. 719-723
  213. Shimizu, N., & Sokawa, Y. (1979) 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in lymphocytes from normal mouse. *J. Biol. Chem.* 254. 12034-12037
  214. Shimizu, N., & Sokawa, Y. (1983) (2'-5')oligoadenylate synthetase in pig spleen: isolation and characterizaion. *J. Biochem.*(Tokyo) 94. 1421-1428

215. Proietti, E., Gessani, S., Belardelli, F., & Gresser, I. (1986) Mouse peritoneal cells confer an antiviral state on mouse cell monolayers: role of interferon. *J. Virol.* **57**. 456-463
216. Grasso, G., Muscettola, M., & Bocci, V. (1983) The physiological interferon response. I. Cells attached to intrauterine devices release interferon *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **173**. 276-280
217. Tomida, M., Yamamoto, Y., & Hozumi, M. (1982) Stimulation by interferon of induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**. 30-37
218. Fisher, P.B., Miranda, A.F., Babiss, L.E., Pestka, S., & Weinstein, B.I. (1983) Opposing effects of interferon produced in bacteria and of tumor promoters on myogenesis in human myoblast cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**. 2961-2965
219. Multhaupt, C., & Lough, J. (1986) Interferon-mediated inhibition of differentiation in a murine myoblast cell line. *J. Cellul. Physiol.* **126**. 211-215
220. Rossi, G.B., Dolei, Z., Cioe, L., Benedetto, A., Matarese, G.P., & Belardelli, F. (1977) Inhibition of transcription and translation of globin messenger RNA in dimethyl sulfoxide-stimulated Friend erythroleukemic cells treated with interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**. 2036-2040
221. Fisher, P.B., Mufson, R.A., & Weinstein, I.B. (1981) Interferon inhibits melanogenesis in B-16 mouse melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**. 823-830
222. Keay, S., & Grossberg, S.E. (1980) Interferon inhibits the conversion of 3T3-L1 mouse fibroblasts into adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**. 4099-4103
223. Gey, G.O., Coffman, W.D., & Kubicek, M.T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**. 364-365
224. Hiscott, J., Cantell, K., & Weissmann, C. (1984) Differential expression of human interferon genes. *Nuc. Acids Res.* **12**. 3727-3745